

Die Funktion LHC-ähnlicher Proteine in der Assemblierung der Photosysteme und der Regulation der Chlorophyllbiosynthese

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

von
M.Sc. Daniel Hey

Präsidentin
der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan
der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Kristina Kühn
2. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber
3. Prof. Dr. Bernhard Grimm

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2019

Zusammenfassung

Die pflanzliche *Light-harvesting complex* (LHC)-Proteinfamilie besteht aus Proteinen mit vielfältigen Funktionen, wobei die der namensgebenden *Light-harvesting complex*-Proteine (LHCPs) vermutlich am besten verstanden ist. Die LHCPs bilden als Lichtsammelkomplexe (LHCI/LHCII) die Antennen beider Photosysteme (PSI/PSII), d.h. sind für die Lichtaufnahme und Energieweiterleitung an die Reaktionszentren sowie für die Dissipation überschüssiger Anregungsenergie zuständig. An der Dissipation ist ebenfalls ein weiterer Vertreter der LHC-Familie, die S-Untereinheit von PSII (PsbS), beteiligt. Die Funktion der übrigen Vertreter, der *Early-light inducible proteins* (ELIPs), *Stress-enhanced proteins* (SEPs) und *One-helix proteins* (OHPs) ist weniger eindeutig. Während die SEP3-Isoformen (auch *Light-harvesting like 3*, LIL3.1 und LIL3.2) funktionell mit der Phytol-Pyrophosphat synthetisierenden Geranylgeranyl-Reduktase (CHLP) in Verbindung gebracht werden konnten, war die Rolle der OHPs zu Beginn dieser Arbeit gänzlich unklar. Den cyanobakteriellen OHP-Homologen, *High-light inducible proteins* (Hlips), welche die einzigen Vertreter der LHC-Familie in Cyanobakterien darstellen und daher als evolutionäre Vorläufer aller LHC-Proteine gelten, wurde im Gegensatz dazu eine Vielzahl an Funktionen zugeschrieben: Sie umfassen die Regulation früher Schritte der Chlorophyllbiosynthese, Assemblierung der Photosysteme und deren Photoprotektion. Strukturell unterscheiden sich die Vertreter der LHC-Familie in der Zahl ihrer Transmembranhelices (PsbS: vier, LHCPs, ELIPs: drei, SEPs: zwei, OHPs: eine). Je eine oder zwei dieser Helices weisen ein charakteristisches Motiv mit konservierten Aminosäuren auf, welche wenigstens in den LHCPs erwiesenermaßen an der Bindung von Chlorophyllmolekülen beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LIL3 nicht nur mit CHLP, sondern auch mit der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) interagiert. Sowohl CHLP als auch POR werden über die Interaktion zu LIL3 an die Thylakoidmembran gebunden und dadurch stabilisiert. Beide Enzyme liefern die direkten Vorstufen für den von der Chlorophyll-Synthase (CHLG) katalysierten finalen Chlorophyll-Syntheseschritt. LIL3 selbst interagiert aber nicht mit CHLG. Neben der Bestätigung der bereits früher gezeigten Chlorophyllbindung von LIL3 konnte eine Affinität zu den späten Intermediaten der Chlorophyllbiosynthese Proto IX, MgP, MgPMME und Protochlorophyllid (Pchlid) nachgewiesen werden. Die größte Affinität bestand dabei gegenüber dem Substrat von POR, Pchlid. Basierend auf diesen Erkenntnissen wird LIL3 als Regulator der späten Chlorophyllbiosynthese-Schritte vorgeschlagen: LIL3 transportiert Substrate zwischen den Enzymen und ermöglicht durch die Bindung von CHLP und POR die Synthese der Chlorophyll-Edukte in räumlicher Nähe. Dadurch wird die Versorgung von CHLG mit dessen Edukten favorisiert.

Für die OHPs konnte gezeigt werden, dass beide Varianten – OHP1 und OHP2 – ausschließlich Heterodimere bilden und Chlorophyll sowie Carotinoide im Verhältnis 3:1 binden. Die Pigmentbindung basiert auf den konservierten Aminosäuren im Chlorophyllbindemotiv und setzt eine Heterodimerisierung voraus: Beide OHP-Varianten alleine können keine Pigmente binden und sind daher inaktiv. An das OHP1-OHP2-Dimer bindet der PSII-Assemblierungsfaktor HCF244 und wird dadurch an der Membran verankert. HCF244 stabilisiert das OHP-Heterodimer und beide OHPs stabilisieren sich gegenseitig. Der heterotrimere OHP1-OHP2-HCF244-Komplex ist für die D1-Synthese wesentlich. Es wird vermutet, dass die OHPs an der co-translationalen Beladung von (p)D1 mit Pigmenten beteiligt sind sowie frühe Assemblierungsintermediate von PSII vor überschüssiger Anregungsenergie schützen.

Summary

The plant light-harvesting complex (LHC) protein family comprises different members with a variety of functions. The eponymous light-harvesting complex proteins (LHCPs) form the outer antennae (LHCI/LHCII) of both photosystems I and II (PSI/PSII) and thus are responsible for light-harvesting and transfer of excitation energy to the reaction centers, as well as photoprotective energy dissipation. In the latter processes the S-subunit of PSII is involved as well. In contrast, the specific function of the other members of the LHC-family, namely the early-light inducible proteins (ELIPs), stress-enhanced proteins (SEPs) and one-helix proteins (OHPs) remains largely elusive. A functional connection of the two SEP3-isoforms (also known as light-harvesting like 3, LIL3.1/LIL3.2) to the geranylgeranyl-reductase enzyme (CHLP) was proven. However, prior to this thesis it was known not much about the function of the two OHP-variants in detail. The situation is completely different concerning the evolutionary predecessors of the LHC-family, the cyanobacterial high-light inducible proteins (Hlips), to which a number of functions has been assigned including regulation of chlorophyll biosynthesis, assembly of photosystems, and photoprotection. The members of the LHC-family can be distinguished regarding their number of transmembrane helices (PsbS: four, LHCPs, ELIPs: three, SEPs: two, OHPs: one). In addition, one or two of these helices contain a characteristic motif with conserved amino acids that have been shown to be involved in chlorophyll binding at least in the LHCPs.

In this thesis, an interaction of LIL3 not only with CHLP, but also with protochlorophyllide-oxidoreductase (POR) could be established. LIL3 tethers CHLP and POR to the thylakoid membrane, thereby conferring stability and protection against proteolytic degradation towards both enzymes. Both CHLP and POR are synthesising the chlorophyll precursors phytyl-pyrophosphate and Pchl_{ide}, which are combined to chlorophyll by the subsequent chlorophyll synthase (CHLG). In addition to the chlorophyll binding ability of LIL3 reported earlier, an affinity of LIL3 towards the chlorophyll biosynthesis intermediates Proto IX, MgP, MgPMME, and Pchl_{ide} could be shown. Interestingly, the highest affinity of LIL3 was exerted towards Pchl_{ide} which is the substrate of POR. Therefore, LIL3 was postulated to play a regulatory role in the late chlorophyll biosynthesis: LIL3 may shuffle the intermediates between enzymes and bring CHLP and POR in close proximity, which may help to supply CHLG with its substrates. However, LIL3 itself does not interact with CHLG. In summary, the function of LIL3 may help in optimizing the flow through the late steps of the chlorophyll biosynthesis pathway.

Regarding the function of the OHPs an exclusive heterodimer formation of both the OHP1 and OHP2 variants could be shown. The OHP1-OHP2-heterodimer is able to bind chlorophyll and carotenoids in an approximate 3:1 ratio and pigment binding depends on dimer formation as well as the presence of the conserved amino acids in the chlorophyll binding motif. Consequently, both variants individually are unable to bind pigments and are therefore essentially inactive. The PSII-assembly factor HCF244 is anchored to the thylakoid membrane by binding to both OHPs, thereby stabilizing the OHP-heterodimer. In addition, both OHPs stabilize each other with OHP2 being the dominant variant. The heterotrimeric OHP1-OHP2-HCF244-complex is essential for D1 biosynthesis, although the exact molecular function of HCF244 is still unknown. It is suggested that the OHP-dimer is responsible for cotranslational loading of (p)D1 with pigments as well as photoprotection of early PSII assembly intermediates.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Photosynthese	11
1.1.1	Ablauf der Photosynthese	12
1.1.1.1	Photosystem II	12
1.1.1.2	Cytochrom b_6f -Komplex	14
1.1.1.3	Photosystem I	14
1.1.1.4	ATP-Synthase	15
1.1.1.5	CO ₂ -Fixierung	16
1.1.2	Assemblierung der Photosysteme	16
1.1.2.1	Assemblierung von PSI	16
1.1.2.2	Assemblierung von PSII	17
1.1.2.3	PSII-Reparaturzyklus	21
1.1.2.4	Photosystem-Assemblierung und Chlorophyllbiosynthese	22
1.1.3	Die Assemblierungsfaktoren Ycf39/HCF244 und HCF173	23
1.2	Tetrapyrrolbiosynthese	24
1.2.1	Synthese der 5-Aminolävulinsäure	24
1.2.2	Synthese von Protoporphyrin IX	26
1.2.3	Häm-Synthese	26
1.2.4	Chlorophyll-Synthese	26
1.2.4.1	Von Protoporphyrin IX zum Protochlorophyllid	26
1.2.4.2	Die NADPH-Protochlorophyllid-Oxidoreduktase	27
1.2.4.3	Synthese von Chlorophyll a und b	28
1.2.5	Regulationsmechanismen der Tetrapyrrolbiosynthese	28
1.2.5.1	Kontrolle der ALA-Biosynthese	29
1.2.5.2	Regulation über den Redoxstatus	29
1.2.5.3	Kontrolle durch posttranslationale Modifikationen	30
1.3	Die LHC-Proteinfamilie	31
1.3.1	LHC-Proteine (LHCPs)	31
1.3.2	PsbS und die LIL-Proteine	33
1.3.2.1	PsbS	33
1.3.2.2	ELIPs	33
1.3.2.3	SEP1/2	34
1.3.2.4	SEP3/LIL3	34
1.3.2.5	OHPs	36
1.3.3	Cyanobakterielle Hlips	37
1.3.3.1	Hlips in der PSII-Synthese	38
1.3.3.2	Hlips und die Chlorophyllbiosynthese	39
1.3.4	Chlorophyllbindung durch die Proteine der LHC-Familie	39
1.3.4.1	Pigmentbindung an LHCI	39
1.3.4.2	Pigmentbindung an Hlips	41
1.4	Zielstellung der Arbeit	42
2	Publikationen	43
2.1	Publikation I: LIL3-POR Interaktion	44
2.2	Publikation II: OHP2-HCF244 Interaktion	45
2.3	Publikation III: Beitrag von OHP1 zur Stressresistenz	46
3	Weiterführende Ergebnisse	47
3.1	Posttranslationale Regulation der OHPs	47
3.1.1	Redoxkontrolle von OHP1	47
3.1.1.1	<i>In vitro</i> -Redoxassay	47

3.1.1.2	Redoxassay mit Thylakoiden	47
3.1.1.3	Komplementation von <i>ohp1</i> mit einer OHP1-C76A-Variante	49
3.1.1.4	Redoxassay mit OHP1-WT und C76A-Komplementationslinien . .	50
3.1.2	Phosphorylierung von OHP2	52
3.2	Verbindung der OHPs zur Chlorophyllbiosynthese	54
3.3	Analyse der Stabilität von OHP1 in Protease-Mutanten	56
3.4	Konstitutives Silencing und Überexpression der <i>OHP</i> -Gene	57
3.4.1	OHP1-RNAi-Linien	57
3.4.1.1	Phänotyp der OHP1-RNAi-Linien	57
3.4.1.2	Vergleich von OHP1-RNAi und VIGS-OHP1	59
3.4.2	OHP1- und OHP2-Überexpressionslinien im Wildtyp-Hintergrund	59
3.4.2.1	Phänotyp der OHP1- und OHP2-OX-Linien	59
3.4.3	OHP1- und OHP2-Überexpressionslinien im <i>hcf244</i> -Hintergrund	61
3.4.3.1	Phänotyp der <i>hcf244</i> /OHP1- und <i>hcf244</i> /OHP2-OX-Linien	61
3.5	Funktion von OHP1 und OHP2 unter Stressbedingungen	63
3.5.1	Verhalten der <i>OHP</i> -Expression bei Lichtstress	63
3.5.2	OHP1-RNAi- und OHP1-OX bzw. OHP2-OX-Linien unter Lichtstress	64
3.6	TEM-Analyse in OHP-defizienten Pflanzen	66
3.7	Komplementationsversuche der <i>ohp</i> -Mutanten	68
3.7.1	Komplementation von <i>ohp2</i> mit verkürzten OHP2-Varianten	68
3.7.1.1	Phänotyp der OHP2-Deletions-Komplementationslinien	68
3.7.2	Komplementation von <i>ohp1/2</i> mit mutiertem Chlorophyllbindemotiv	71
3.7.2.1	Chlorophyllbindemotiv der LHC-Proteinfamilie	71
3.7.2.2	Phänotyp der OHP1-AAA-Linien	72
3.7.2.3	Interaktion von OHP1-AAA mit OHP2	74
3.7.2.4	Stabilität der OHP1-AAA-Variante	75
3.7.2.5	Phänotyp der OHP2-AAA-Linien	77
3.7.2.6	Interaktion von OHP2-AAA mit OHP1 und HCF244	77
3.7.3	Komplementation von <i>ohp2</i> mit einer HCF244-TMH _{tAPX} -Variante	78
3.7.3.1	Phänotyp der <i>ohp2</i> /HCF244-TMH _{tAPX} -Linien	79
3.7.3.2	Phänotyp der <i>hcf244</i> /HCF244-TMH _{tAPX} -Linien	80
3.8	Chlorophyllbindestudien mit rekombinanten OHP-Proteinen	82
3.8.1	Methodenetablierung mittels Rekonstitution von LHCB1.1	82
3.8.2	Rekonstitution von OHP1/OHP2	84
3.9	Analyse der Interaktion von OHP2 mit dem plastidären Ribosom	89
4	Diskussion	91
4.1	Einfluss der OHPs auf die Thylakoidmembranbiogenese	91
4.2	Der OHP1-OHP2-HCF244-Komplex in der D1-Synthese	93
4.3	OHP1 unter Lichtstress und im frühen Entwicklungsstadium	98
4.4	Chlorophyllbindung des OHP1-OHP2-Heterodimers	100
4.5	Posttranslationale Kontrolle der OHPs	104
4.6	Einfluss der OHPs und LIL3 auf die Chlorophyllbiosynthese	107
4.7	Gemeinsamkeiten der LIL3- und OHP-Funktionsweise	111
4.8	Zusammenfassung und Ausblick	113
5	Materialien und Methoden	115
5.1	Materialien	115
5.2	Pflanzenlinien und Pflanzenanzucht	115
5.2.1	Pflanzenanzucht auf Erde	115
5.2.2	Sterile Pflanzenanzucht	115
5.2.3	Pflanzenlinien	115

5.3	Bakterienanzucht und Proteinexpression	117
5.3.1	Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>Agrobacterium</i>	117
5.3.2	Stabile und transiente Pflanzentransformation mit <i>Agrobacterium</i>	117
5.3.3	Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Proteinaufreinigung	117
5.4	Molekularbiologische Methoden	117
5.4.1	DNA-Gelelektrophorese	117
5.4.2	DNA-Extraktion	118
5.4.3	Genotypisierungs-PCR	118
5.4.4	Primersequenzen	118
5.4.5	Vektoren zur Proteinexpression	120
5.4.6	Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung	120
5.4.7	Restriktionsverdau	120
5.4.8	Ligation	120
5.4.9	Vektoren für die Pflanzentransformation und Proteinexpression	120
5.4.10	Transformation von <i>E. coli</i> und <i>Agrobacterium</i>	121
5.4.11	Plasmid-DNA-Isolation mittels alkalischer Lyse	121
5.4.12	RNA-Extraktion	121
5.4.13	cDNA-Synthese	121
5.4.14	qPCR-Analyse	122
5.5	Protein-Gelelektrophorese und Western Blot	122
5.5.1	SDS-PAGE und Tricin-SDS-PAGE	122
5.5.2	BN-PAGE/CN-PAGE und 2D-SDS-PAGE	122
5.5.3	Western Blot	122
5.6	Pigmentextraktion und Quantifizierung	123
5.7	Proteinbiochemische Methoden und Interaktionsassays	123
5.7.1	Isolation von Thylakoiden	123
5.7.2	Redoxassays	123
5.7.2.1	Redoxassay mit rekombinanten OHP-Proteinen	123
5.7.2.2	Redoxassay mit Thylakoiden	124
5.7.3	Phosphorylierungsassay	124
5.7.4	Fraktionierung in lösliche und Membranfraktionen	124
5.7.5	His-Tag-Pulldown	124
5.7.6	Interaktion rekombinanter Proteine mit dem plastidären Ribosom	125
5.7.6.1	Isolation von plastidären Ribosomen	125
5.7.6.2	Interaktionsassay mittels Größenausschlusschromatographie	125
5.7.7	Fixierung von Blattmaterial für die Elektronenmikroskopie	125
5.7.8	Rekonstitution von rekombinanten Proteinen mit Pigmenten	125
5.7.8.1	Isolation von Membranfraktionen aus <i>E. coli</i>	126
5.7.8.2	Rekonstitution und His-Tag-Aufreinigung	126
5.7.8.3	Fluoreszenzspektroskopie	126
5.7.9	Lichtstress-Assay	126
	Literatur	127
	Danksagung	143
	Selbstständigkeitserklärung	145

Abbildungsverzeichnis

1.1	Photosynthetische Elektronentransportkette	12
1.2	Assemblierung und Reparaturzyklus von PSII	18
1.3	Tetrapyrrolbiosynthese höherer Pflanzen	25
1.4	Die LHC-Proteinfamilie und die Antennen der Photosysteme	32
1.5	Aufbau der OHP-Proteine	37
1.6	Sequenzanalyse der Hlips	38
1.7	Chlorophyllbindung durch LHCII	40
3.1	<i>In vitro</i> -Redoxversuche mit OHP1	48
3.2	Komplementation von <i>ohp1</i> mit einer OHP1-C76A-Variante	49
3.3	Redoxassay mit den OHP1-WT und OHP1-C76A-Komplementationslinien	51
3.4	Untersuchung der OHP2-Phosphorylierung	53
3.5	Verbindung der OHPs zur Chlorophyllbiosynthese	55
3.6	Untersuchung der OHP-LIL3-Interaktion	55
3.7	Analyse der Stabilität von OHP1 in Protease-Mutanten	56
3.8	Phänotyp der OHP1-RNAi-Linien	58
3.9	Vergleich von OHP1-RNAi und VIGS-OHP1	58
3.10	Phänotyp der OHP1- und OHP2-Überexpressionslinien	60
3.11	Phänotyp der OHP1- und OHP2-Überexpressionslinien im <i>hcf244</i> -Hintergrund	62
3.12	Expression von OHP1 und OHP2 unter Lichtstress.	64
3.13	OHP1-RNAi- und OHP1- bzw. OHP2-OX-Linien unter Lichtstress	65
3.14	Chloroplastenmorphologie in OHP-defizienten Pflanzen	67
3.15	Komplementation von <i>ohp2</i> mit verkürzten OHP2-Varianten	70
3.16	Komplementation von <i>ohp1</i> mit einer Chlorophyllbindemotivmutante	73
3.17	Membranassoziation der OHP1-AAA-Variante	74
3.18	Analyse der Stabilität des OHP1-AAA-Proteins	76
3.19	Komplementation von <i>ohp2</i> mit einer Chlorophyllbindemotivmutante	78
3.20	Interaktion von OHP1 mit OHP2-AAA	79
3.21	Komplementation von <i>ohp2</i> mit einer membrangebundenen HCF244-Variante	80
3.22	Komplementation von <i>hcf244</i> mit einer membrangebundenen HCF244-Variante	81
3.23	Rekonstitution von LHCB1.1 mit Pigmenten	83
3.24	Rekonstitution von OHP1/OHP2 mit Pigmenten	85
3.25	Analyse der rekonstituierten OHP1/OHP2-Komplexe	86
3.26	Analyse der Interaktion von OHP2 mit dem plastidären Ribosom	90
4.1	Assemblierung und Stabilisierung des OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes.	94
4.2	Funktion des OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes	96
4.3	Modell der Pigmentbindung an das OHP1-OHP2-Heterodimer	102
4.4	Modell der LIL3-Funktion	109

Tabellenverzeichnis

3.1	Rekonstitution von LHCB1.1	83
3.2	Rekonstitution von OHP1/OHP2	87

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ALA	5-Aminolävulinsäure
ALAD	ALA-Dehydratase
ALB3	ALBINO3
APX	Ascorbatperoxidase
ATP	Adenosintriphosphat
β -Car	β -Carotin
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BN-PAGE	Blue Native PAGE
CAO	Chlorophyll(id) a-Oxygenase
CDS	Codierende Sequenz
Chl	Chlorophyll
CHLG	Chlorophyll-Synthase
Chlid	Chlorophyllid
CHLM	Mg-Protoporphyrin IX Methyltransferase
CHLP	Geranylgeranyl-Reduktase
CHS	<i>siehe CHLG</i>
Clp	Caseinolytische Protease
CN-PAGE	Clear Native PAGE
Copro III	Coproporphyrinogen III
CPO	Coproporphyrinogen III Oxidase
Cyt	Cytochrom
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f-Komplex
DDM	β -Dodecylmaltosid
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
DVR	Divinyl-Reduktase
ELIP	Early-light inducible protein
Fd	Ferredoxin
FeCh	Ferrochelataase
FLU	FLUORESCENT IN BLUE LIGHT
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GBP	GluTR-Bindeprotein
GGPP	Geranylgeranyl-Pyrophosphat
GGR	<i>siehe CHLP</i>
Glu	Glutamat
GluRS	Glutamyl-tRNA-Synthetase
GluTR	Glutamyl-tRNA ^{Glu} -Reduktase
GOGAT	Glutamin- α -Ketoglutarat-Aminotransferase
GSA	Glutamat-1-semialdehyd
GSAT	Glutamat-1-semialdehyd-Aminotransferase
GUN4	GENOME UNCOUPLED 4
HCF	HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE
HL	Starklicht
Hlip	High-light inducible protein
HMB	Hydroxymethylbilan
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LHC	Light-harvesting complex
LHCI	Photosystem I-Antenne
LHCII	Photosystem II-Antenne
LHCP	Light-harvesting complex protein
HO	Häm-Oxygenase
LIL	Light-harvesting like
LPA1	LOW PHOTOSYSTEM II ACCUMULATION 1
LPE1	LOW PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY 1
LQY1	LOW QUANTUM YIELD 1
LTO1	LUMENAL THIOL-OXIDOREDUCTASE 1
MgCh	Magnesium-Chelatase

Abkürzung	Bedeutung
MgCY	Mg-Protoporphyrin IX-Monomethylester-Zyklase
MgMT	siehe CHLM
MgP	Mg-Protoporphyrin IX
MgPMME	Mg-Protoporphyrin IX-Monomethylester
Mrd	Milliarde
NDH	NADH-Dehydrogenase-like
NPQ	Nichtphotochemisches Quenching
NTRC	NADPH-abhängige Thioredoxin Reduktase C
OEC	Oxygen-evolving Complex
OG	Octylglukosid
OHP	One-helix protein
OX	Überexpression
PΦB	Phytochromobilin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Pulse-amplitude modulation
PAM68	PHOTOSYNTHESIS AFFECTED MUTANT 68
PBG	Porphobilinogen
Pc	Plastocyanin
PchlId	Protochlorophyllid
PDM	PratA-defined membrane
PGR5	PROTON-GRADIENT REGULATION 5
PGR1	PGR5-like
Pheo	Phäophytin
PhQ	Phyllochinon
Phytol-PP	Phytol-Pyrophosphat
PLB	Prolamellarkörper
POR	NADPH-Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
PPOX	Protoporphyrinogen IX-Oxidase
PQ	Plastoquinon
PQH ₂	Plastoquinol
Proto IX	Protoporphyrin IX
Proton IX	Protoporphyrinogen IX
Psa	Untereinheit von Photosystem I
Psb	Untereinheit von Photosystem II
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RIBA1	Bifunktionales Riboflavin Biosynthese-Enzym 1
RC	Reaktionszentrum
RPL	Ribosomales Protein der großen Untereinheit
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SCP	Small CAB-like protein, <i>siehe Hlip</i>
SDR	Short-chain Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEP	Stress-enhanced protein
SRP	Signal Recognition Particle
STN7	STATE-TRANSITION KINASE 7
tAPX	thylakoidgebundene Ascorbatperoxidase
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
THF1	THYLAKOID FORMATION 1
TMH	Transmembranhelix
TP-BS	Tetrapyrrolbiosynthese
Trx	Thioredoxin
UROD	Uroporphyrinogen III Decarboxylase
Urogen III	Uroporphyrinogen III
UROS	Uroporphyrinogen III Synthase
VIGS	Virus-induced gene silencing
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Photosynthese

Die Photosynthese ist eine der beeindruckendsten biochemischen Prozesse auf unserem Planeten, und in vielfältiger Weise Grundlage für das Leben, wie wir es kennen: Nicht nur waren es die frühen marinen photosynthetisierenden Organismen, die Sauerstoff in die Atmosphäre abgaben und dadurch den Weg für landbewohnende höhere Organismen ebneten. Auch heute stehen photosynthetisierende Organismen am Anfang der Nahrungsketten, und fossile Energieträger hauptsächlich aus sedimentierten und verrotteten photosynthetisierenden Organismen liefern immer noch mehr als 80% der weltweit benötigten Energie (JOHNSON 2016). Waren es anfangs einzellige Organismen – Purpurbakterien, Grüne Schwefel- und Nichtschwefelbakterien und Cyanobakterien – so führte die endosymbiotische Aufnahme der Cyanobakterien zur Bildung der Chloroplasten – auf die Photosynthese spezialisierten Zellorganellen in Algen und Landpflanzen. Während Cyanobakterien und daher auch die Organismen mit Chloroplasten oxygene Photosynthese betreiben, führen die anderen genannten Organismen verschiedene Formen anoxygener Photosynthese durch.

Heute noch sind Cyanobakterien für 50% der weltweiten Photosyntheseleistung verantwortlich. Alle photosynthetisierenden Organismen zusammengekommen sequestrieren jährlich etwa 200 Milliarden (Mrd) Tonnen CO₂ aus der Atmosphäre. Die Umwandlung von CO₂ in Biomasse erfordert im Wesentlichen (von Mikro-/Makronährstoffen abgesehen) nur Wasser und Sonnenlicht, wobei anoxygen photosynthetisierende Organismen zusätzlich einen alternativen – von Wasser verschiedenen – Elektronendonator benötigen. Sonnenlicht wird über ein besonderes Pigment – Chlorophyll (Chl) – eingefangen und nutzbar gemacht. Die Chloroplasten höherer Pflanzen enthalten zu diesem Zweck ein hoch organisiertes Membransystem, die Thylakoidmembranen, in welches die großen (Pigment)-Protein-Komplexe der Photosynthese, die Photosysteme I und II (PSI/PSII), der Cytochrom b₆f-Komplex (Cyt b₆f) und die ATP-Synthase eingebettet sind. In Cyanobakterien liegen die – einfacher gebauten – Thylakoide dagegen frei im Cytoplasma vor.

Bezüglich der Verteilung der Komplexe in der Thylakoidmembran besteht eine sog. laterale Heterogenität: PSII ist hauptsächlich in den Grana-Thylakoiden (Stapel von Thylakoidmembranen) und PSI in den Stroma-Thylakoiden (frei im Chloroplasten-Stroma vorliegende Thylakoidmembranen) lokalisiert. Die ATP-Synthase ist ebenfalls an den Außenseiten der Grana-Stapel sowie in den Stroma-Thylakoiden anzutreffen, der Cyt b₆f-Komplex ist dagegen weitestgehend gleichmäßig verteilt. Durch einen lichtgetriebenen Elektronentransport (s.u.), in dessen Rahmen Wasser gespalten und Sauerstoff freigesetzt wird (weltweit insgesamt etwa 140 Mrd Tonnen jährlich), kommt es zur Synthese von ATP und NADPH. Diese Energieträger werden dann zur Fixierung von CO₂ aus der Luft und Bildung von Kohlenhydraten genutzt.

Am Beginn der Photosynthese steht daher das Pigment Chl, welches integraler Bestandteil der großen Pigment-Protein-Komplexe PSI und PSII sowie der pflanzlichen Antennenkomplexe, der *Light-harvesting complexes* (LHCs), ist. Chl absorbiert Licht im blauen und roten Spektralbereich,

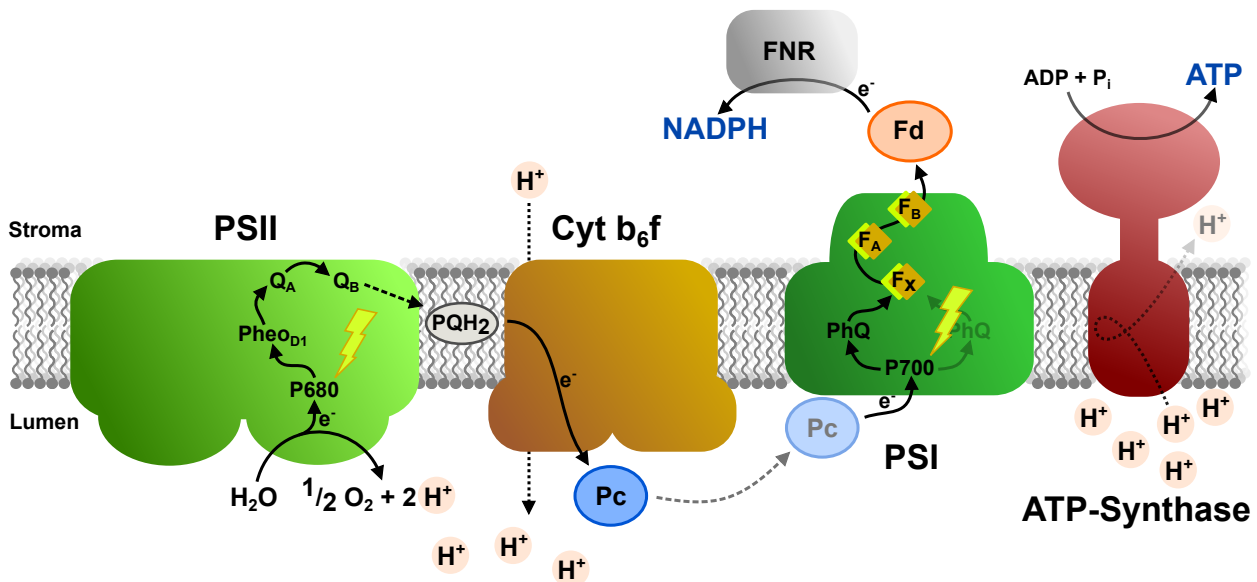


Abbildung 1.1: Photosynthetische Elektronentransportkette. Dargestellt sind die Proteinkomplexe der Photosynthese (PSII, Cyt b_6f , PSI und die ATP-Synthase). Die wichtigsten am Elektronentransport beteiligten Kofaktoren von PSII und PSI sind eingezeichnet (Abkürzungen siehe Text), die dimere Struktur von PSII und Cyt b_6f ist angedeutet. Der lineare Elektronentransport, d.h. der Fluss von Elektronen aus Wasser über PSII \rightarrow PQ \rightarrow Cyt b_6f \rightarrow Pc \rightarrow PSI \rightarrow Fd \rightarrow NADPH ist gezeigt. Gestrichelte Pfeile bedeuten eine Bewegung des jeweiligen Elektronencarriers, gepunktete Pfeile den Fluss der Protonen. Der zyklische Elektronentransport um PSI sowie die Kofaktoren im Cyt b_6f -Komplex sind zur Vereinfachung ausgelassen. Die Endprodukte der Photosynthese, ATP und NADPH, sind in blauer Schrift dargestellt.

und die beiden in höheren Pflanzen vorkommenden Chl-Spezies a und b haben leicht von einander verschiedene Absorptionsmaxima. Zusätzlich gibt es noch weitere akzessorische Pigmente, Carotinoide, die neben einer Erweiterung des photosynthetisch nutzbaren Spektralbereichs an der Photoprotektion, dem Schutz vor Lichtstress, mitwirken.

Während der grundsätzliche Ablauf der Photosynthese und auch der Synthese des Chl-Moleküls weitestgehend aufgeklärt ist, besteht anhaltendes Forschungsinteresse an der Regulation beider Prozesse: dem Ablauf der sequentiellen Assemblierung der Photosynthese-Komplexe sowie einer potentiellen Verknüpfung von Chl-Biosynthese und Photosystem-Assemblierung. Eine Co-Regulation und funktionelle Assoziation der Prozesse ist naheliegend, da die Chl-Moleküle während der Membran-Integration der Chl-bindenden Photosystem-Untereinheiten bereitgestellt werden müssen, um diese zu stabilisieren. Gleichzeitig kann aufgrund der Phototoxizität freien Chlorophylls keine Chl-Synthese auf Vorrat stattfinden (KOMENDA *et al.* 2012b).

1.1.1 Ablauf der Photosynthese

1.1.1.1 Wasserspaltung am Photosystem II

Die Photosynthese beginnt mit der Aufnahme eines Photons durch Chl bzw. Carotinoide im PSII (bzw. durch die am PSII angedockten Haupt- und Nebenantennen, s.u.). Durch Excitonentransfer wird die Anregungsenergie von den Antennen bis ins Reaktionszentrum (RC) von PSII weitergeleitet, in welchem ein spezielles Paar (*Special Pair*) von Chl a-Molekülen lokalisiert ist, das aufgrund seines entsprechenden Absorptionsmaximums bei 680nm als P680 bezeichnet wird. Dieses Paar an

Chl-Molekülen ist insofern besonders, als dass es nach Anregung ein Elektron abgibt (Ladungstrennung) und dadurch zu einem sehr starken Oxidationsmittel wird ($P680^+$). Das RC wird von den Proteinen D1 und D2 gebildet, weitere Kernuntereinheiten von PSII sind CP43 und CP47, die als innere Antenne funktionieren und Anregungsenergie von den peripheren Antennen ins RC weiterleiten (GAO *et al.* 2018).

Vom *Special Pair* wird ein Elektron an ein Phäophytin ($Pheo_{D1}$) abgegeben (Abb. 1.1). Möglicherweise ist ein weiteres, in der Nähe vom RC gebundenes Chl a (Chl_{D1}) ebenfalls an der Ladungstrennung beteiligt (CAFFARRI *et al.* 2014). In jedem Fall leitet $Pheo_{D1}$ das Elektron seinerseits an ein von PSII fest gebundenes Plastochinon (Q_A) weiter. Der Elektronentransport innerhalb des RC verläuft ausschließlich über die an D1 gebundenen Kofaktoren, obwohl eine vergleichbare Anordnung auch im D2-Protein vorliegt. Von Q_A findet Elektronentransport auf ein schwach gebundenes austauschbares Plastochinon (Q_B) statt. Zwei Elektronen werden von Q_B sequentiell aufgenommen, begleitet von der Bindung zweier Protonen aus dem Chloroplasten-Stroma. Plastochinon (PQ) wird dadurch zu Plastochinol (PQH_2) reduziert. PQH_2 wird in den in der Thylakoidmembran lokalisierten PQ-Pool entlassen und aus diesem gegen ein PQ ausgetauscht.

Das oxidierte $P680^+$ erhält sein Elektron aus der Spaltung von Wasser zu Sauerstoff am PSII zurück. Die Wasserspaltung findet an einem Mangan-Cluster (Mn_4CaO_5 -Cluster) statt, auch *Oxygen-evolving Complex* (OEC) genannt, einer speziellen Anordnung von vier Mn-, fünf O- und einem Ca-Atom. Zwei Wassermoleküle werden dort schrittweise unter Abgabe von vier Elektronen zu molekularem Sauerstoff oxidiert. Dabei wechseln die Mn-Atome teilweise zwischen verschiedenen Oxidationsstufen (Kok-Zyklus). Die Abgabe der Elektronen zur Reduktion von $P680^+$ erfolgt jeweils einzeln (VINYARD *et al.* 2013). Zur Verbindung des an der lumenalen Seite von PSII gelegenen Mangan-Clusters mit $P680$ dient ein dazwischen gelegenes redoxaktives Tyrosin (Tyr_Z). Bei der Wasserspaltung werden neben molekularem Sauerstoff und den vier abgezogenen Elektronen auch vier Protonen frei, die in das Thylakoidlumen abgegeben werden. Am PSII tragen daher sowohl diese vier Protonen als auch die von PQ während dessen Reduktion aus dem Stroma aufgenommenen Protonen zum Aufbau des Protonengradienten über die Thylakoidmembran bei (JOHNSON 2016).

In Pflanzen liegt funktionales PSII in der Regel als Dimer vor, welches durch Bindung verschiedener Antennenkomplexe Superkomplexe unterschiedlicher Größe und Stöchiometrie bilden kann. Kristallstrukturen von PSII-LHCII-Superkomplexen (inklusive LHCII-S/M und CP24/26/29, vgl. Abschnitt 1.3.1) aus *P. sativum* waren durch die Anwesenheit von 28 Untereinheiten und 203 Pigmentmolekülen charakterisiert (CAO *et al.* 2018). Die membranintrinsischen Kernuntereinheiten D1, D2, CP43 und CP47 sind hauptsächlich an der Bindung der Kofaktoren und Pigmente beteiligt, dies sind in der D1-Untereinheit z. B. vier Chl a-, zwei Pheo- und ein β -Carotin (β -Car)-Molekül (CAO *et al.* 2018). Neben den Kernuntereinheiten und den lumenalen, den OEC stabilisierenden Untereinheiten PsbO, PsbP und PsbQ enthält PSII noch eine Vielzahl weiterer sehr kleiner Untereinheiten. Die meisten dieser kleinen Untereinheiten besitzen eine einzige Transmembranhelix (mit Ausnahme des zwei Helices enthaltenden Proteins PsbZ). Sie umgeben das RC und sind nötig für die Stabilisierung des PSII-Kernkomplexes, Dimerisierung von PSII und den Kontakt zur peripheren Antenne. Weiterhin wirken sie an der Photoprotektion von PSII mit (SHI *et al.* 2004; GAO *et al.* 2018).

1.1.1.2 Oxidation von PQH₂ am Cytochrom b₆f-Komplex

Die Re-Oxidation von PQH₂ zu PQ findet am Cyt b₆f-Komplex statt. Dieser überträgt die Elektronen weiter auf Plastocyanin (Pc), ein im Thylakoidlumen lokalisiertes, lösliches Carrierprotein (Abb. 1.1). Im Gegensatz zum PQ ist Pc ein Ein-Elektronen-Carrier, der diese über ein zwischen den Oxidationsstufen +I und +II wechselndes Kupfer-Ion binden kann. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der von PQ und Pc gebundenen Elektronen kann die Übertragung nur schrittweise, im sogenannten Q-Zyklus stattfinden: Eines der beiden Elektronen von PQH₂ wird dabei über einen 2Fe-2S-Cluster und Häm *f* auf Pc übertragen, das andere über zwei Häm-Moleküle (Häm *b*₆^L und Häm *b*₆^H) auf ein PQ an einer weiteren Bindestelle. Dieses PQ wird bei der Oxidation eines zweiten PQH₂-Moleküls und entsprechender Reduktion von Pc ebenfalls zu PQH₂ umgesetzt, sodass letztendlich durch die Oxidation von einem PQH₂ zwei Pc reduziert werden (KURISU *et al.* 2003; JOHNSON 2016). Die bei der Oxidation von PQH₂ frei werdenden Protonen werden ins Thylakoidlumen abgegeben, das am Cyt b₆f-Komplex neu gebildete PQH₂ nimmt aus dem Stroma zwei Protonen auf. Der Beitrag von Cyt b₆f zum Protonengradient umfasst daher pro umgesetztem PQH₂ vier ins Lumen abgegebene und zwei vom Stroma aufgenommene Protonen.

Der Cyt b₆f-Komplex besteht aus den vier die Kofaktoren bindenden Kernuntereinheiten (Cytochrom (Cyt) *f*, Cyt *b*₆, das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein und Untereinheit IV) sowie weiteren kleinen Untereinheiten. Auch der Cyt b₆f-Komplex liegt in Pflanzen als Dimer vor.

1.1.1.3 Oxidation von Plastocyanin am Photosystem I, Bildung von NADPH

Am PSI wird Pc oxidiert und die Elektronen auf den Stroma-lokalisierten Elektronen-Carrier Ferredoxin (Fd) übertragen (Abb. 1.1). Dieser wird dann unter anderem zur Bildung von NADPH genutzt. Wie PSII besitzt auch PSI ein *Special Pair* zweier Chl *a*-Moleküle, dieses zeigt aber ein Absorptionsmaximum bei 700nm und wird daher als P700 bezeichnet. Die Anregungsenergie gelangt wie beim PSII von Antennensystemen sowie von PSI-gebundenen Pigmenten über Exzitonentransfer zum P700. Nachdem P700 angeregt wurde, kann es ein Elektron abgeben. Dieses wird über ein in der Nähe zum P700 gebundenes Chl *a*-Molekül (Chl A₀, möglicherweise ist noch ein weiteres Chl *a*, Chl *e*C2, ebenfalls an der Ladungstrennung beteiligt), ein Phyllochinon (PhQ) sowie drei 4Fe-4S Eisen-Schwefel-Cluster (F_X, F_A und F_B) an den Ein-Elektronen-Carrier Fd übertragen (CAFFARRI *et al.* 2014). Fd kann über die Fd-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) oxidiert werden. Dabei wird NADPH gebildet (Abb. 1.1), welches im Calvin-Zyklus zur CO₂-Fixierung benötigt wird (s.u.). Der Elektronenmangel des oxidierten P700⁺ wird durch Oxidation von Pc wieder aufgefüllt. Im PSI sind wie im PSII die am Elektronentransport beteiligten Kofaktoren (mit Ausnahme der Fe-S-Cluster) zweifach vorhanden. Im Gegensatz zum PSII werden im PSI aber beide Wege genutzt, die Elektronen werden im F_X zusammengeführt (CAFFARRI *et al.* 2014).

PSI liegt in Pflanzen im Gegensatz zum PSII und dem Cyt b₆f als Monomer vor, und vier LHCI-Antennenproteine sind an einem PSI-Monomer angedockt (s.u.). In Cyanobakterien bildet PSI dagegen Trimere. Angemerkt werden sollte hier auch, dass in Cyanobakterien keine LHCs existieren und die Antennenfunktion für beide Photosysteme stattdessen von den Phycobilisomen ausgeübt

wird. Die beiden sehr großen, knapp die Hälfte der Masse von PSI beitragenden und das RC von PSI bildenden Kernuntereinheiten PsaA und PsaB binden die am Elektronentransport beteiligten Kofaktoren P700, Chl A₀, Chl eC2 und F_X sowie weitere Chl a- und β -Car-Moleküle. Das an der Stromaseite angedockte PsaC enthält F_A und F_B. Weitere, kleine Untereinheiten binden ebenfalls zusätzliche Pigmente. Zudem sind sie für die Interaktion von PSI zu Pc (PsaF) und Fd (PsaD/E), für die Stabilisierung anderer Untereinheiten und die Bindung von LHCI von Bedeutung (JENSEN *et al.* 2007). Die Analyse der Kristallstruktur des PSI-LHCI-Komplexes aus *P. sativum* zeigte die Anwesenheit von 16 Untereinheiten, 156 Chlorophyllen und 36 Carotinoiden (MAZOR *et al.* 2017).

Als linearer Elektronentransport wird der Fluss von Elektronen aus der Wasserspaltung über PSII, PQ, Cyt b₆f, Pc und PSI auf NADPH bezeichnet (Abb. 1.1). Als weiteres Produkt der Photosynthese wird über die Nutzung des Protonengradienten ATP gebildet (s.u.). Bei der Umsetzung von zwei Molekülen Wasser am PSII, d.h. dem Transport von insgesamt vier Elektronen, entstehen zwei Moleküle NADPH. Gleichzeitig wird der Protonengradient um 12 lumenale Protonen erhöht (über die Wasserspaltung am PSII bzw. der Oxidation/Reduktion von PQ/PQH₂ an Cyt b₆f), die zur Synthese von 2,5 Molekülen ATP genutzt werden können (ROCHAIX 2011). Zur CO₂-Fixierung werden neben zwei Molekülen NADPH jedoch drei Moleküle ATP benötigt. Durch einen alternativen, zyklischen Elektronentransport-Weg können Elektronen von Fd statt auf NADPH zurück auf PQ übertragen werden, dessen Oxidation am Cyt b₆f-Komplex dann weiter zum Aufbau des Protonengradienten und damit zur ATP-Synthese beiträgt. Neben der Ausbalancierung der NADPH/ATP-Produktion für die CO₂-Fixierung kann der zyklischen Elektronentransport allgemein zur Deckung zellulärer Bedürfnisse von ATP genutzt werden. Zusätzlich bewirkt die verstärkte Absenkung des pH-Wertes im Thylakoidlumen eine Aktivierung photoprotektiver Mechanismen (Nichtphotochemisches Quenching, NPQ, s.u.) (ROCHAIX 2011; SHIKANAI 2014). Für den zyklischen Elektronentransport existieren zwei Wege, der PROTON-GRADIENT REGULATION 5 (PGR5)-abhängige und der NADH-Dehydrogenase-like (NDH)-Komplex-abhängige (BUSCH *et al.* 2011). PGR5 zusammen mit PGR5-like (PGRL1) bzw. der NDH-Komplex bilden dafür Megakomplexe mit einer kleinen Menge von PSI-LHCI, wobei der PGR5-PGRL1-Weg vermutlich hauptsächlich für den zyklischen Elektronentransport genutzt wird (SHIKANAI 2014).

1.1.1.4 ATP-Synthese durch die CF₁F_o-ATPase

Wie oben beschrieben wird im Zuge des Elektronentransports ein Protonengradient/pH-Gradient (Δ pH) über die Thylakoidmembran aufgebaut. Die ATP-Synthase (bzw. CF₁F_o-ATPase) nutzt den pH-Gradient zur ATP-Synthese aus ADP und P_i (Abb. 1.1): Der membranständige F_o-Motor, dessen wesentlicher Bestandteil in Pflanzen ein Ring aus 14 c-Untereinheiten (bzw. 13-15 c-Untereinheiten in verschiedenen Cyanobakterien-Stämmen, POGORYELOV *et al.* 2007) ist, transportiert Protonen entlang des Gradienten und treibt damit eine Rotation der $\gamma\epsilon$ -Untereinheiten an. Diese Rotation führt zu einer sequentiellen Konformationsänderung der $\alpha_3\beta_3$ -Untereinheiten im katalytisch aktiven F₁-Kopf. Jede der drei α -Untereinheiten kann pro Rotation ein Molekül ATP aus ADP und P_i synthetisieren, sodass durch den Fluss von 14 Protonen drei Moleküle ATP gebildet werden (HAHN *et al.* 2018).

1.1.1.5 CO₂-Fixierung

Primäres Ziel der lichtabhängigen Reaktionen der Photosynthese ist die Bereitstellung von ATP und NADPH zur nachfolgenden Fixierung von CO₂. Dafür ist das Enzym Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) von entscheidender Bedeutung. Die Carboxylierung eines Moleküls Ribulose-1,5-Bisphosphat führt zur Bildung von zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat, welche ATP- und NADPH-abhängig (2x ATP, 2x NADPH) zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) umgesetzt werden. Infolge der Fixierung von drei Molekülen CO₂ werden sechs Moleküle GAP gebildet, wobei die drei fixierten CO₂-Moleküle netto zur Neubildung eines der sechs Moleküle GAP eingesetzt wurden. Die übrigen (fünf) Moleküle GAP werden zur Regenerierung von Ribulose-1,5-Bisphosphat benötigt (Calvin-Benson-Zyklus). Dieser Prozess verbraucht pro Molekül CO₂ noch ein weiteres Molekül ATP, sodass pro fixiertem CO₂ im Idealfall insgesamt 3x ATP und 2x NADPH benötigt werden (JOHNSON 2016).

RuBisCO bildet lösliche, Stroma-lokalisierte Komplexe aus jeweils acht großen und kleinen Untereinheiten (RbcL/RbcS). Wie der Name des Enzyms andeutet, kann neben der Carboxylierung auch eine (in der Regel unerwünschte) Oxygenierung von Ribulose-1,5-Bisphosphat, d.h. Umsetzung von O₂ statt CO₂, erfolgen. Die ATP-verbrauchende Verstoffwechslung des dabei entstehenden Phosphoglykolats zur Regeneration von 3-Phosphoglycerat wird Photorespiration genannt (JOHNSON 2016).

1.1.2 Assemblierung der Photosysteme

Die großen Pigment-Protein-Komplexe PSI und PSII, sowie auch der Cyt b₆f-Komplex und die ATP-Synthase sind auf eine geordnete und koordinierte Assemblierung angewiesen. Die Assemblierung umfasst sowohl die schrittweise Assoziation der Untereinheiten als auch die Integration der Kofaktoren, wobei an den Einzelschritten eine Vielzahl an Assemblierungsfaktoren beteiligt sind. PSI bleibt nach der Synthese vermutlich recht stabil, auch wenn unter photoinhibitorischen Lichtbedingungen bei niedrigen Temperaturen ein Abbau (bzw. möglicherweise eine Reparatur) stattfindet (YANG *et al.* 2015). Dagegen bedarf PSII einer ständigen Reparatur, die in Form einer partiellen De-Assemblierung, gefolgt vom proteolytischen Abbau geschädigter D1-Untereinheiten, Re-Insertion von D1 und Re-Assemblierung der PSII-Komplexe abläuft (PSII-Reparaturzyklus, s.u.).

1.1.2.1 Assemblierung von PSI

Die Assemblierung des PSI verläuft vermutlich sehr schnell. Daran sind sowohl Kern- als auch Plastiden-codierte Assemblierungsfaktoren beteiligt, die zwar zumindest teilweise zwischen Cyanobakterien und Pflanzen konserviert sind, deren Funktionen aber nicht notwendigerweise identisch geblieben sind. Pflanzen besitzen gegenüber Cyanobakterien zudem zusätzliche Faktoren (YANG *et al.* 2015). Die Assemblierung des PSI beginnt mit der co-translationalen Integration von PsaA und PsaB in die Thylakoidmembran, begleitet von der Insertion der Pigmente und Kofaktoren. Dabei

dient PsaB vermutlich als stabilisierender Anker für PsaA (YANG *et al.* 2015). Für die Membranintegration von PsaA und PsaB ist die Insertase ALBINO3 (ALB3) wesentlich (GÖHRE *et al.* 2006). Die Faktoren VIPP1 (ZHANG *et al.* 2014) und PPD1 (LIU *et al.* 2012) sind ebenfalls an der Synthese von PsaA und PsaB beteiligt. ALB3 ist zudem zuständig für die posttranslationale Membranintegration der kerncodierten *Light-harvesting complex proteins* (LHCPs) in die Thylakoidmembran (SCHÜNEMANN 2004) und auch an der PSII-Assemblierung beteiligt (s.u.).

PsaA und PsaB bilden ein Heterodimer inklusive der am Elektronentransport beteiligten Kofaktoren. Anschließend erfolgt die Insertion von F_X . An der Insertion von F_X sowie am Einbau von F_A und F_B in stromal lokalisiertes PsaC (noch vor dessen Assoziation mit PsaA/B), sind die Faktoren RubA (SHEN *et al.* 2002), *HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE 101* (HCF101) (SCHWENKERT *et al.* 2009) und CnfU (YABE *et al.* 2004) beteiligt. Im Anschluss an die Bindung von PsaC an PsaA/B erfolgt die Assoziation von PsaD und PsaE an die stromale Seite von PSI. PsaC-E bilden den sog. *Stromal Ridge* (YANG *et al.* 2015). Für dessen Aufbau sind die Faktoren Ycf3, Ycf4 (BOUDREAU *et al.* 1997) und Y3IP1 (ALBUS *et al.* 2010) notwendig. Vermutlich werden anschließend die kleinen membranintegralen (für die Assoziation von phosphoryliertem LHCII verantwortlichen, s.u.) Untereinheiten PsaH-L angedockt. Dies führt zur Bildung des einzigen bisher in signifikanten Mengen detektierten Intermediats der PSI-Assemblierung, PSI* (WITTENBERG *et al.* 2017). PSI* ist bereits zur Ladungstrennung und Reduktion von Fd in der Lage, auch wenn die Akzeptorseite von PSI noch nicht aufgebaut ist. Die von PSI* ausgehende, weitere Assemblierung von PSI ist auf die Insertion von PsaF zwingend angewiesen (WITTENBERG *et al.* 2017). PsaF sowie PsaN sind Voraussetzung für die Bindung und Oxidation von Pc an PSI (SCHÖTTLER *et al.* 2011). Der Einbau der verbleibenden kleinen Untereinheiten (PsaJ,K,G,N), vermutlich unter Beteiligung von Pyg7 (WILDE *et al.* 2001) und Psa2 (FRISTEDT *et al.* 2014), sowie das Andocken der ALB3-abhängig membranintegrierten LHCI-Antennen schließt dann die Bildung des funktionalen PSI-LHCI-Komplexes ab (SCHÖTTLER *et al.* 2011; YANG *et al.* 2015).

1.1.2.2 Assemblierung von PSII

Vergleichbar zum Aufbau von PSI basiert die Assemblierung von PSII in Cyanobakterien wie in Pflanzen auf konservierten Assemblierungsfaktoren (mit nicht notwendigerweise konservierter Funktionalität), wobei Pflanzen zusätzliche Faktoren besitzen. Während in Cyanobakterien die Assemblierung in der sog. *PratA-defined membrane* (PDM) abläuft, findet sie in Chloroplasten in den Stromalamellen der Thylakoidmembran statt. Das funktionelle PSII migriert daraufhin in die Grana-Thylakoide. Der Mechanismus der Assemblierung ist aber vermutlich konserviert und basiert im Wesentlichen auf der sequentiellen Assemblierung von Modulen, die um die vier Kernuntereinheiten D1, D2, CP43 und CP47 herum aufgebaut sind (KOMENDA *et al.* 2012b; NICKELSEN *et al.* 2013). An jedem Assemblierungsschritt ist eine Vielzahl an Faktoren beteiligt (Abb. 1.2 A), auch wenn deren exakte molekulare Funktion nur in wenigen Fällen genau charakterisiert ist (LU 2016).

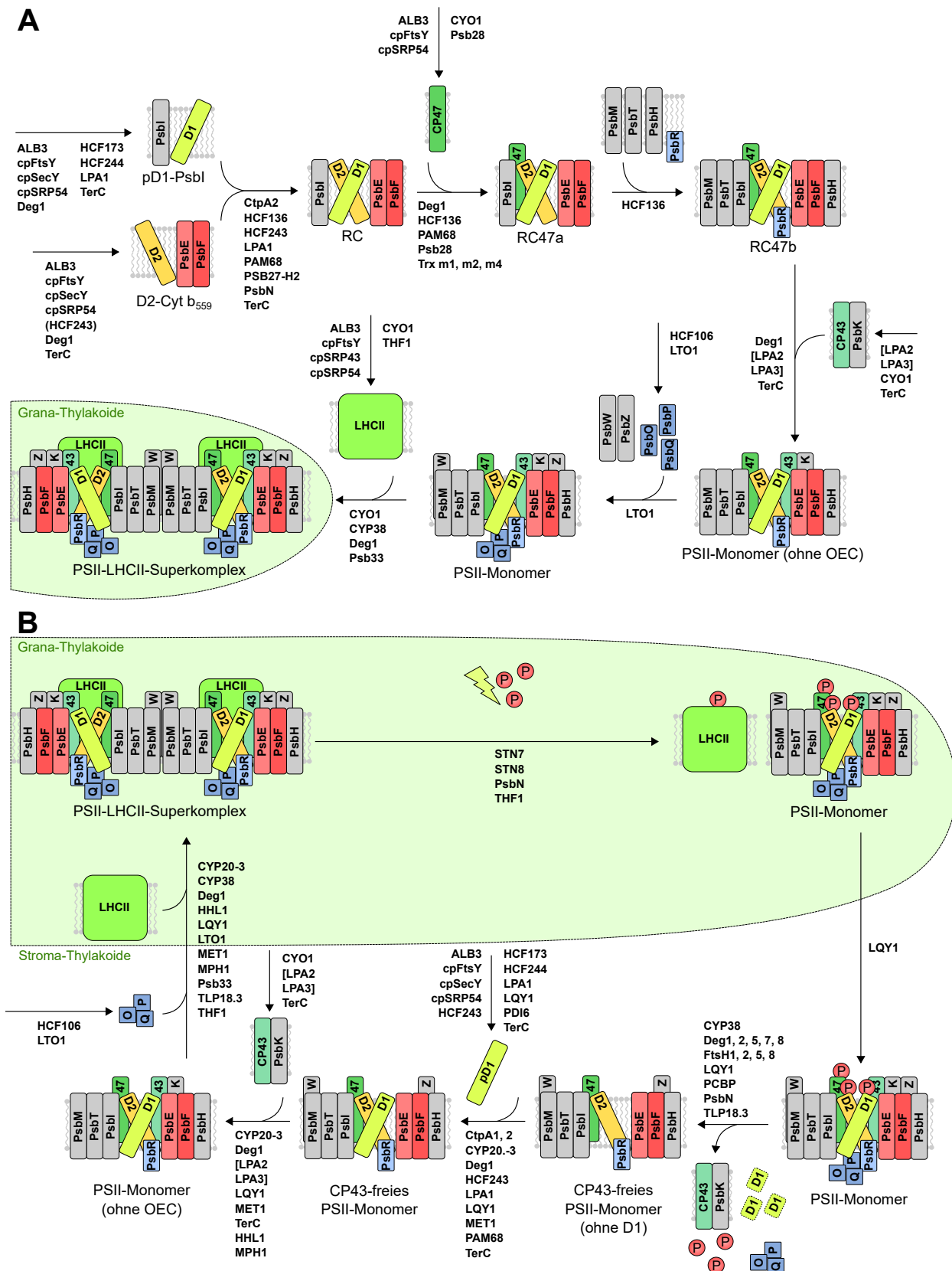


Abbildung 1.2: Assemblierung und Reparaturzyklus von PSII. Die an den jeweiligen Schritten der Assemblierung (A) bzw. am Reparaturzyklus (B) beteiligten Faktoren, sowie die PSII-Intermediate sind angegeben (Erläuterung der Abkürzungen und detaillierte Beschreibung im Fließtext). Die gebundenen Pigmente und Cofaktoren sind ausgelassen. Für die Abbildung wurden Fig. 1 und Fig. 2 aus Lu (2016) als Vorlage verwendet.

D1- und D2-Synthese Die Assemblierung von PSII beginnt mit der Synthese der D1- und D2-Module (Abb. 1.2 A) (KOMENDA *et al.* 2012b). D1 und D2 sind (wie CP43 und CP47) Plastiden-codierte Proteine, die co-translational in die Thylakoidmembran integriert werden. Von den unterschiedlichen plastidären Transportsystemen in und durch die Thylakoidmembran ist das *Signal Recognition Particle* (SRP)-System, bestehend aus cpSRP54, cpFtsY, der Translokase cpSecY und ALB3 (HENRY *et al.* 2007), an der Membranintegration von D1 (und möglicherweise auch D2 und CP47) beteiligt (LU 2016): Wenigstens für D1 konnten Zwischenstufen der Insertion in einem Komplex mit cpSRP-Komponenten nachgewiesen werden (HENRY *et al.* 2007; WALTER *et al.* 2015). Die Faktoren HCF173 (SCHULT *et al.* 2007; LINK *et al.* 2012) zusammen mit LOW PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY 1 (LPE1) (JIN *et al.* 2018), und Ycf39/HCF244 (LINK *et al.* 2012) (s.u.) sind für die Stabilisierung der *psbA*-mRNA, sowie die Translationsinitiation von *psbA* essentiell.

D1 wird als unreifes Vorläuferprotein mit einer C-terminalen Extension synthetisiert und in die Membran insertiert (pD1) (IVLEVA *et al.* 2000). pD1 bildet dann zusammen mit der PsbI-Untereinheit das pD1-Modul. Das D2-Modul andererseits besteht aus D2 sowie PsbE/F, welche den Cyt b₅₅₉-Teil von PSII darstellen. Das Vorliegen von Cyt b₅₅₉ ist Voraussetzung für die Akkumulation von D2, während das D2-Modul nötig für die Stabilisierung des pD1-Moduls und generell den Beginn der PSII-Assemblierung ist (KOMENDA *et al.* 2004). An der Synthese der pD1- und D2-Module sind die Faktoren HCF243 (Synthese bzw. Stabilisierung von pD1 und D2, ZHANG *et al.* 2011), TerC (an der co-translationalen Insertion beteiligt, SCHNEIDER *et al.* 2014), die Protease Deg1 (siehe auch Abschnitt 1.1.2.3, Chaperon-Funktion gegenüber den vier Kernuntereinheiten, SUN *et al.* 2010b), und hinsichtlich pD1 auch LOW PSII ACCUMULATION 1 (LPA1, PENG *et al.* 2006[†], pflanzliches „funktionelles“ Homolog des cyanobakteriellen PrtA-Proteins, KLINKERT *et al.* 2004; NICKELSEN *et al.* 2013) beteiligt. Für PrtA wird zumindest in Cyanobakterien eine Funktion in der Beladung von D1 mit Mn²⁺-Ionen vermutet (STENGEL *et al.* 2012). Die Pigmente werden in pD1 wahrscheinlich co-translational insertiert. In Cyanobakterien ist daran ein Ycf39-Hlip-CHLG-Komplex beteiligt (siehe Abschnitt 1.3.3.1, CHIDGEY *et al.* 2014; KNOPPOVÁ *et al.* 2014). Die Bindung von Chl durch D1 (aber auch D2, CP43 und CP47) ist nötig für die Stabilisierung der Proteine und deren Schutz vor proteolytischem Abbau (EICHACKER *et al.* 1996; HE *et al.* 1998). Die Assoziation von *psbA* und anderen, Chl-bindenden Proteinen codierenden mRNAs mit plastidären Ribosomen scheint aber unabhängig von der Chl-Verfügbarkeit zu sein (ZOSCHKE *et al.* 2017).

Bildung des RC-Komplexes Das pD1 und das D2-Modul werden zum RC-Komplex kombiniert (Abb. 1.2 A) (KOMENDA *et al.* 2012b). Beteiligt sind daran einerseits weiterhin die oben beschriebenen Faktoren HCF243, LPA1 und TerC (LU 2016). Zum anderen kommt eine ganze Reihe von Faktoren ins Spiel, die auch in die weitere Reifung und Prozessierung der späteren RC-Komplexe involviert sind. Dies sind unter anderem PHOTOSYNTHESIS AFFECTED MUTANT 68 (PAM68, ARMBRUSTER *et al.* 2010), PsbN (KRECH *et al.* 2013) und Ycf48/HCF136 (PLÜCKEN *et al.* 2002; KOMENDA *et al.* 2008). Ycf48/HCF136 wirkt ebenfalls bei der Stabilisierung von pD1 mit. PsbN und HCF136 sind entscheidend für die Kombination von pD1 und D2 zum RC-Komplex. Neben der Kombination von pD1 und D2 zum RC findet eine Prozessierung des C-Terminus' von pD1 zum reifen D1-Protein statt (in Cyanobakterien über die Zwischenstufe iD1, NICKELSEN *et al.* 2013),

[†]Korrektur des Artikels in *The Plant Cell* 2018, 30:1, S.245-248.

wofür die Faktoren PSB27-H2 (auch LPA19, WEI *et al.* 2010) und die Protease CtpA2 (ANBUDURAI *et al.* 1994) nötig sind. Die C-terminale Prozessierung von D1 ist unabdingbar für die weitere Assemblierung von PSII und den Einbau des Mn_4CaO_5 -Clusters (ROOSE *et al.* 2004; BAO *et al.* 2016).

Synthese und Insertion von CP47 Die co-translationale Integration von CP47 hängt ebenfalls vom cpSRP-System ab. Weiterhin sind an der CP47-Synthese die Faktoren Deg1, HCF136, PAM68, PSB28 (DOBÁKOVÁ *et al.* 2009), sowie die plastidären *m*-Typ Thioredoxine (Trx) *m1*, *m2* und *m4* beteiligt (WANG *et al.* 2013). Letztere scheinen für den Erhalt des korrekten Redoxstatus' von CP47 während dessen Synthese zuständig zu sein. Ebenso ist für die ordnungsgemäße Faltung Cystein-enthaltender Untereinheiten wie CP47 (und CP43) der Faktor CYO1 relevant (MURANAKA *et al.* 2012). Neuere Erkenntnisse deuten zudem darauf hin, dass HCF136 auf der lumenalen Seite der Membran gemeinsam mit PAM68 auf der stromalen Seite CP47 in der zur Aufnahme von Pigmenten benötigten Konformation halten (BUČINSKÁ *et al.* 2018). Dabei nimmt PAM68 Kontakt zum translatierenden Ribosom auf. Die Insertion von CP47 in das RC ergibt den RC47a-Komplex, der durch Integration der Untereinheiten PsbH/M/T/R unter Mithilfe von HCF136 zum RC47b-Komplex erweitert wird (Abb. 1.2 A) (LU 2016). In Cyanobakterien wird CP47 vermutlich als Komplex mit PsbH/(L)/T vorassembliert und zusammen mit diesen in den RC-Komplex eingebaut (KOMENDA *et al.* 2012b). Die Interaktion von PAM68 mit den Faktoren HCF136, LPA1, LPA2 und ALB3 macht eine unterstützende Funktion des Proteins in der Bildung der späteren RC47-Komplexe aus dem RC wahrscheinlich (ARMBRUSTER *et al.* 2010).

Insertion von CP43 und weiteren kleinen Untereinheiten CP43 wird zusammen mit PsbK (bzw. mit PsbK/Z/30 in Cyanobakterien) in den RC47b-Komplex eingebaut (LU 2016). An der Synthese von CP43 sind die Faktoren CYO1, TerC gemeinsam mit ALB3 (SCHNEIDER *et al.* 2014), sowie am Einbau von CP43 zusammen mit PsbK in RC47b die Faktoren Deg1, LPA2 und LPA3 beteiligt (MA *et al.* 2007; CAI *et al.* 2010)[‡]. In Cyanobakterien stabilisiert Psb27 freies CP43 (KOMENDA *et al.* 2012a). Im Anschluss erfolgt die lichtabhängige Aktivierung des OECs (Photoaktivierung, DASGUPTA *et al.* 2008), sowie die Bindung der den OEC abschirmenden Untereinheiten PsbO/P/Q (NICKELSEN *et al.* 2013; LU 2016). Wenigstens für die korrekte Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke in PsbO ist eine lumenale Thiol-Oxidoreduktase (LTO1) notwendig (FENG *et al.* 2011; LU *et al.* 2013). In Cyanobakterien erfolgt noch die Assemblierung der extrinsischen Untereinheiten PsbU/V, zudem in Cyanobakterien wie in Pflanzen die Assemblierung der Untereinheiten PsbW/Z (LU 2016).

Dimerisierung und Bildung von PSII-LHCII Superkomplexen Nach Dimerisierung des reifen PSII-Monomers und Bindung der LHCII-Antennen kommt es zur Bildung der PSII-LHCII-Superkomplexe (Abb. 1.2 A) (NICKELSEN *et al.* 2013; LU 2016). An der Superkomplex-Assemblierung, d.h. der Verbindung von LHCII mit PSII, sind wenigstens PSB33 (FRISTEDT *et al.* 2015) und die PsbW-Untereinheit beteiligt (GARCÍA-CERDÁN *et al.* 2011). Die kerncodierten Proteine der LHCII-Komplexe werden unter Mitwirkung von CYO1 und ALB3-abhängig in die Thylakoidmembran integriert und mit Pigmenten versehen (LU 2016).

[‡]Die entsprechenden Publikationen von MA *et al.* (2007) und CAI *et al.* (2010) wurden zurückgezogen: Retraction Notes in *The Plant Cell* 2016, 28:12, S. 3061 bzw. *Plant Physiology* 2017, 173:2, S. 1526.

1.1.2.3 PSII-Reparaturzyklus

Unter Starklichtbedingungen, aber – wenn auch in geringerem Maße – bereits bei niedrigen Lichtintensitäten, kommt es zu einer Beschädigung der D1-Untereinheit und damit zur Inaktivierung des betroffenen PSII-Komplexes. Für PSII existiert daher ein Reparaturmechanismus, der PSII-Reparaturzyklus, der zum Austausch photogeschädigter D1-Untereinheiten dient. Überwiegt die Rate der Photoschädigung von PSII der Reparatur kommt es zur Photoinhibition, d.h. zum Verlust der PSII-Aktivität. Interessanterweise scheint die relative Anfälligkeit von PSII gegenüber Photoschädigung aber nicht nur ein unerwünschter Effekt zu sein, sondern zum Schutz von PSI beizutragen: Durch die stetige und lichtabhängige Inaktivierung eines Teils von PSII wird der Redoxdruck auf PSI vermindert (SONOIKE 2011).

Grundsätzlich lassen sich zwei Mechanismen der D1-Schädigung unterscheiden (ANDERSSON *et al.* 2004): Der Akzeptorseiten-Mechanismus beruht darauf, dass im Falle eines vollständig reduzierten PQ-Pools die Q_B -Bindestelle unbesetzt ist, was zur Bildung abnormaler, zweifach reduzierter Q_AH_2 -Spezies führen kann. Die folgende Ablösung von Q_AH_2 , d.h. eine unbesetzte Q_A -Bindestelle, ermöglicht die Re-Reduktion von $P680^+$ durch $Pheo_{D1}^-$ unter Bildung eines Chl-Moleküls im Triplett-Zustand. Dieses generiert in der Reaktion mit O_2 hochreaktiven Singulett-Sauerstoff. Der Donorseiten-Mechanismus dagegen tritt ein, wenn die Rate an angelieferten Elektronen aus der Wasserspaltung an der Donorseite von PSII nicht mit der Elektronenabgabe an der Akzeptorseite (d.h. der PQ-Reduktion) mithalten kann. Ein langlebiges $P680^+$ kann dann Elektronen aus seiner näheren Umgebung abziehen, und somit oxidative Schädigung von Aminosäuren bewirken.

Am PSII-Reparaturzyklus sind zum Teil die identischen Assemblierungsfaktoren wie an der Neusynthese von PSII beteiligt (Abb. 1.2 B). Zusätzlich gibt es aber auch Faktoren, denen spezielle Funktionen im Reparaturzyklus zugeschrieben werden. Die Reparatur von PSII beginnt mit einer (partiellen) De-Assemblierung der PSII-Komplexe, gefolgt vom proteolytischen Abbau des geschädigten D1-Proteins sowie dessen Neusynthese. Schlussendlich werden die PSII-LHCII-Superkomplexe re-assembliert (JÄRVI *et al.* 2015; LU 2016).

De-Assemblierung der PSII-LHCII-Superkomplexe Während funktionelles PSII in den Grana-Thylakoiden vorliegt, findet die Reparatur wie die Neusynthese in den Stromalamellen statt. Der erste Schritt in der Reparatur von PSII ist daher dessen Migration von den Grana-Thylakoiden in die Stromalamellen sowie die Ablösung der LHCII-Antennen und die Monomerisierung von PSII (Abb. 1.2 B) (LU 2016). Als Signal dafür dient die Phosphorylierung von LHCII und der Kernuntereinheiten D1, D2 und CP43 (sowie PsbH) (LU 2016; THEIS *et al.* 2016). An der Regulation des Phosphorylierungsstatus' beteiligt sind die *State Transition*-Kinasen STN7 (LHCII) und STN8 (Kernuntereinheiten) (BELLAFIORE *et al.* 2005; BONARDI *et al.* 2005) und (auf bislang unklare Weise) PsbN. Der Faktor THYLAKOID FORMATION 1 (THF1) wirkt zudem als Regulator der Superkomplex-Dynamik unter Starklichtbedingungen (HUANG *et al.* 2013). Das PSII-Monomer ist vermutlich während der ganzen Reparatur mit der Protein-Disulfid-Isomerase LOW QUANTUM YIELD 1 (LQY1) assoziiert (LU *et al.* 2011). Nach der Migration in die Stromalamellen kommt es zur Dephosphorylierung der Kernuntereinheiten, wofür die Phosphatase PBCP (SAMOL *et al.*

2012) (möglicherweise unterstützt von TLP18.3, SIRPIÖ *et al.* 2007) zuständig ist. Der Faktor CYP38 verhindert als Phosphatase-Inhibitor dabei zunächst eine vorzeitige Dephosphorylierung (ROKKA *et al.* 2000).

Abbau und Neusynthese von D1 Der proteolytische Abbau von beschädigten D1-Untereinheiten wird von ATP- und Zn^{2+} -abhängigen FtsH-Proteasen sowie von Deg-Proteasen katalysiert. Deg1 schneidet dabei D1 vermutlich von der lumenalen Seite im Loop zwischen dessen Helices 3 und 4 (CD-Loop), während Deg7 D1 von der stromalen Seite schneidet (KAPRI-PARDES *et al.* 2007; SUN *et al.* 2010a). Deg2 kann D1 ebenfalls auf der stromalen Seite (im DE-Loop zwischen den Helices 4 und 5) schneiden (HAUSSÜHL *et al.* 2001). Am weiteren Abbau von D1 sind vor allem die FtsH-Proteasen FtsH2 und FtsH5 beteiligt (BAILEY *et al.* 2002; KATO *et al.* 2009). Der Abbau von D1, begleitet von der Ablösung der Untereinheiten PsbO/P/Q, des OECs und der CP43-Kernuntereinheit führt zum wichtigen Reparatur-Intermediat, dem CP43-freien PSII-Monomer (Abb. 1.2 B) (LU 2016).

Die Synthese von D1 im Rahmen der PSII-Reparatur unterscheidet sich von der Neusynthese insofern, als dass sie die Integration von D1 in das CP43-freie PSII-Monomer benötigt. An der grundsätzlichen Synthese von D1 sind ebenfalls das cpSRP/ALB3-System, HCF173, HCF244, HCF243, LPA1 und TerC beteiligt (LU 2016). Die Protein-Disulfid-Isomerase PDI6 dient als Regulator/Dämpfer der D1-Synthese (WITTENBERG *et al.* 2014). In den Einbau von pD1 in das CP43-freie PSII-Monomer ist wiederum eine Vielzahl an Faktoren involviert: Zum einen die bereits beschriebenen Faktoren Deg1, TerC, HCF243, LPA1, PAM68, sowie die D1-C-terminalen Proteasen CtpA1,2. Zum anderen sind Faktoren beteiligt, die spezifische Funktionen in der Re-Assemblierung von PSII zu besitzen scheinen: CYP20-3 (CAI *et al.* 2008) und MET1 (CP43/CP47-Chaperon während der Reparatur, BHUIYAN *et al.* 2015).

Re-Assemblierung des PSII-Monomers und der PSII-LHCII-Superkomplexe Durch den Einbau von CP43-PsbK (Recycling oder Neusynthese des Moduls) wird das PSII-Monomer wiederhergestellt (LU 2016). Spezifisch an diesem Prozess beteiligte Faktoren sind (neben CYP20-3, LPA2/3 und MET1) HHL1 (Re-Assemblierung des PSII-Monomers, interagiert mit LQY1, JIN *et al.* 2014) und MPH1 (Assemblierung/Stabilisierung von PSII-Monomeren, LIU *et al.* 2015). Die Re-Assemblierung des OECs und der Untereinheiten PsbO/P/Q, die Dimerisierung von PSII sowie die Bindung der LHCII-Antennen nach Migration in die Grana-Thylakoide schließt die PSII-Reparatur ab (Abb. 1.2 B).

1.1.2.4 Verbindungen der Photosystem-Assemblierung zur Chlorophyllbiosynthese

Da die Insertion der Pigmente in die Pigment-bindenden Photosystem-Kernuntereinheiten Voraussetzung für deren Stabilisierung ist und daher co-translational ablaufen muss, erscheint eine Verbindung der Proteinsynthese bzw. Assemblierung der Kernuntereinheiten zur Chl-Biosynthese sinnvoll (NICKELSEN *et al.* 2013; WANG *et al.* 2015). Vor diesem Hintergrund lassen sich funktionelle Verbindungen von Assemblierungsfaktoren zur Chl-Biosynthese annehmen. Die cyanobakterielle ΔPsb28 -Mutante ist durch eine ineffektive Chl-Biosynthese gekennzeichnet, und DOBÁKOVÁ *et al.* (2009) postulierten eine Beteiligung von Psb28 an der Chl-Synthese für CP47

und PsA/B. Eine weitere mögliche Verbindung stellt das cyanobakterielle Pitt-Protein dar, das die Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR, s.u.) stabilisiert und an der Positionierung von POR in der Nähe zur Synthese der Photosysteme beteiligt sein könnte (SCHOTTKOWSKI *et al.* 2009). Während für das pflanzliche Psb28 diesbezüglich keine Daten vorliegen, existiert für Pitt kein definitives Homolog in Pflanzen (BOHNE *et al.* 2016). Möglich wäre, dass es stattdessen – ähnlich zur von in Pflanzen von LPA1 übernommenen PrtA-Funktion – ein „funktionelles“ Homolog in Pflanzen gibt. Weitere Kandidaten für eine Verknüpfung der Photosystem-Assemblierung mit der Chl-Biosynthese sind die Proteine der LHC-Familie, d.h. die cyanobakteriellen Hlips bzw. deren pflanzliche Homologe (OHPs), oder andere LIL-Proteine (siehe dazu Abschnitt 1.3) (WANG *et al.* 2015).

1.1.3 Die Assemblierungsfaktoren Ycf39/HCF244 und HCF173

Ycf39 wurde in *Synechocystis* ursprünglich als an der Insertion von Q_A in D2 während der PSII-Assemblierung beteiligtes Chaperon beschrieben (ERMAKOVA-GERDES *et al.* 1999). Zudem konnte Ycf39 als Teil von frühen PSII-Assemblierungs-Intermediaten nachgewiesen werden (RC(II*)-Komplex), an welche es als funktionelle Einheit mit den Hlips HliC/D bindet (vgl. Abschnit 1.3.3.1) (KNOPPOVÁ *et al.* 2014). Im Detail scheint das Protein mit der D1-Synthese (nicht aber mit der D2-Synthese) in Verbindung zu stehen, und bindet an dieses möglicherweise sogar direkt. KNOPPOVÁ *et al.* (2014) postulierten daher eine Funktion des Ycf39-Hlip-Komplexes in der co-translationalen Belieferung von pD1 mit Chl sowie dem Anregungsenergie-Quenching von Assemblierungs-Intermediaten.

Das pflanzliche Homolog von Ycf39 ist der Faktor HCF244 (At4g35250). HCF-Mutanten wurden ursprünglich über Veränderungen in der Chl-Fluoreszenz identifiziert, die auf Beeinträchtigungen in der Photosystem-Assemblierung hindeuteten (MEURER *et al.* 1996). Ycf39/HCF244 gehört zu den *Atypical Short-Chain* Dehydrogenasen (aSDRs), einer Teilfamilie der großen, evolutionär alten und funktionell diversen Proteinfamilie der SDRs (PERSSON *et al.* 2009; MOUMMOU *et al.* 2012). aSDRs sind u.a. durch Aminosäureveränderungen in der SDR-typischen katalytischen Tetrade gekennzeichnet. Wenngleich HCF244 noch keine exakte molekulare Funktion zugeschrieben werden konnte, wird eine Beteiligung an der Translations-Initiation der *psbA*-mRNA vermutet (LINK *et al.* 2012).

HCF244 wird mit HCF173 (sowie mit OHP2) co-exprimiert (AttedII-Datenbank, OBAYASHI *et al.* 2018). HCF173 gehört ebenfalls zur Familie der aSDR-Proteine und ist wie HCF244 vermutlich gleichfalls an der Translations-Initiation von *psbA* beteiligt (SCHULT *et al.* 2007). Zudem scheint HCF173 für die Stabilisierung des *psbA*-Transkripts notwendig zu sein (SCHULT *et al.* 2007). Da eine *hcf244/hcf173*-Doppelmutante additive Effekte zeigte, wurde eine überlappende Funktion beider Proteine vermutet (LINK *et al.* 2012), die aber nicht notwendigerweise auf einer physischen Interaktion beider Proteine beruhen muss. Dazu passt, dass HCF173 als Teil eines hochmolekularen, RNA-bindenden Komplexes identifiziert werden konnte, HCF244 aber nicht Teil dieses Komplexes war (LINK *et al.* 2012). HCF173 wurde kürzlich weiterhin als Interaktionspartner von LPE1 identifiziert und führt seine Funktion in der D1-Synthese daher vermutlich mit LPE1 zusammen aus (JIN *et al.* 2018).

1.2 Tetrapyrrolbiosynthese

Pflanzen benötigen vier verschiedene Arten von Tetrapyrrolen, welche in der Tetrapyrrolbiosynthese (TP-BS) aufgebaut werden: Häm, Sirohäm, Phytyochromobilin (PΦB) und Chl (TANAKA *et al.* 2007; TANAKA *et al.* 2011) (Abb. 1.3 A). Die TP-BS lässt sich in verschiedene Abschnitte einteilen: Zuerst findet die Synthese des universalen Vorläufermoleküls 5-Aminolävulinsäure (ALA) statt, welches anschließend durch Kondensation von acht Molekülen ALA und Modifikation von Seitengruppen zum gemeinsamen Vorläufer Protoporphyrin IX (Proto IX) umgesetzt wird. Auf dem Weg von ALA zu Proto IX zweigt der Sirohäm-Syntheseweg ab. Durch Insertion eines Eisen- bzw. Magnesium-Ions in den heterozyklischen Ring von Proto IX entsteht Häm *b* (Häm) bzw. Chl *a*, wobei Häm anschließend durch Öffnung des Rings in PΦB umgesetzt werden kann. Chl *a* (bzw. die Vorstufe Chlorophyllid *a* (Chlid *a*)) wird zum Teil durch Oxidation einer Methyl- zur Formyl-Seitengruppe am C⁷ weiter zu Chl *b* verstoffwechselt (Abb. 1.3 B). Jedes der vier Endprodukte der TP-BS hat eine spezifische Funktion: Chl wird ausschließlich für die Photosynthese in den Chloroplasten benötigt (Lichtabsorption und Ladungstrennung, siehe Abschnitt 1.1.1), wobei Chl *a* Bestandteil der Photosysteme und Antennenkomplexe ist, während Chl *b* nur in letzteren zu finden ist. Häm ist unter anderem als Cofaktor der an Oxidations- und Elektronentransportreaktionen beteiligten Enzyme von Bedeutung. PΦB ist der Cofaktor der pflanzlichen Phytochrome, welche als Rotlicht-Rezeptoren z. B. für die Regulation der Photomorphogenese nötig sind. Sirohäm schließlich ist als prosthetische Gruppe Teil der Nitrit- und Sulfid-Reduktase. Die komplette TP-BS findet im Plastiden statt, wobei eine duale Lokalisation der terminalen Schritte der Häm-Synthese nicht vollends ausgeschlossen werden kann.

1.2.1 Synthese der 5-Aminolävulinsäure

Die TP-BS beginnt in höheren Pflanzen mit der Synthese von ALA über den C₅-Weg: Der Ausgangsstoff ist Glutamat (Glu), welches im Plastiden aus α -Ketoglutarat und Glutamin über das Enzym Glutamin- α -Ketoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) gebildet wird (FORDE *et al.* 2007). Glu wird dann zunächst aktiviert, indem es ATP-abhängig an die Glutamyl-tRNA gekoppelt wird: Durch die Aktivität des Enzyms Glutamyl-tRNA-Synthetase (GluRS) entsteht Glutamyl-tRNA^{Glu} (DAY *et al.* 1998). Neben der weiteren Umsetzung im Rahmen der TP-BS ist Glutamyl-tRNA^{Glu} ebenfalls von Bedeutung für die plastidäre Proteinsynthese. Das Enzym Glutamyl-tRNA^{Glu}-Reduktase (GluTR) setzt den Glutamyl-Rest der Glutamyl-tRNA^{Glu} anschließend NADPH-abhängig zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA) um (ILAG *et al.* 1994). Dieser Enzymschritt ist ratenlimitierend für die gesamte TP-BS und wird durch eine Vielzahl von an der GluTR wirkenden Regulationsmechanismen kontrolliert (siehe Abschnitt 1.2.5): Neben der Bindung des inhibitorischen Faktors FLUORESCENT IN BLUE LIGHT (FLU) bzw. des stimulatorischen GluTR-Bindeproteins (GBP) an die GluTR (MESKAUSKIENE *et al.* 2001; CZARNECKI *et al.* 2011) unterliegt das Enzym einer proteolytischen Kontrolle durch das Caseinolytische Protease (Clp)-System (APITZ *et al.* 2016) sowie der antiaggregatorisch wirkenden Chaperonfunktion von cpSRP43 (WANG *et al.* 2018). Die GluTR interagiert zudem vermutlich mit dem nachfolgenden Enzym, der Glutamat-1-semialdehyd-Aminotransferase (GSAT), die GSA zu ALA umwandelt (ILAG *et al.* 1994; MOSER *et al.* 2001). Die strikte Kontrolle der ALA-Biosynthese ist von Bedeutung, da der weitere Syntheseweg bis zum Protochlorophyllid (Pchlid) weitestgehend ungebremst abläuft.

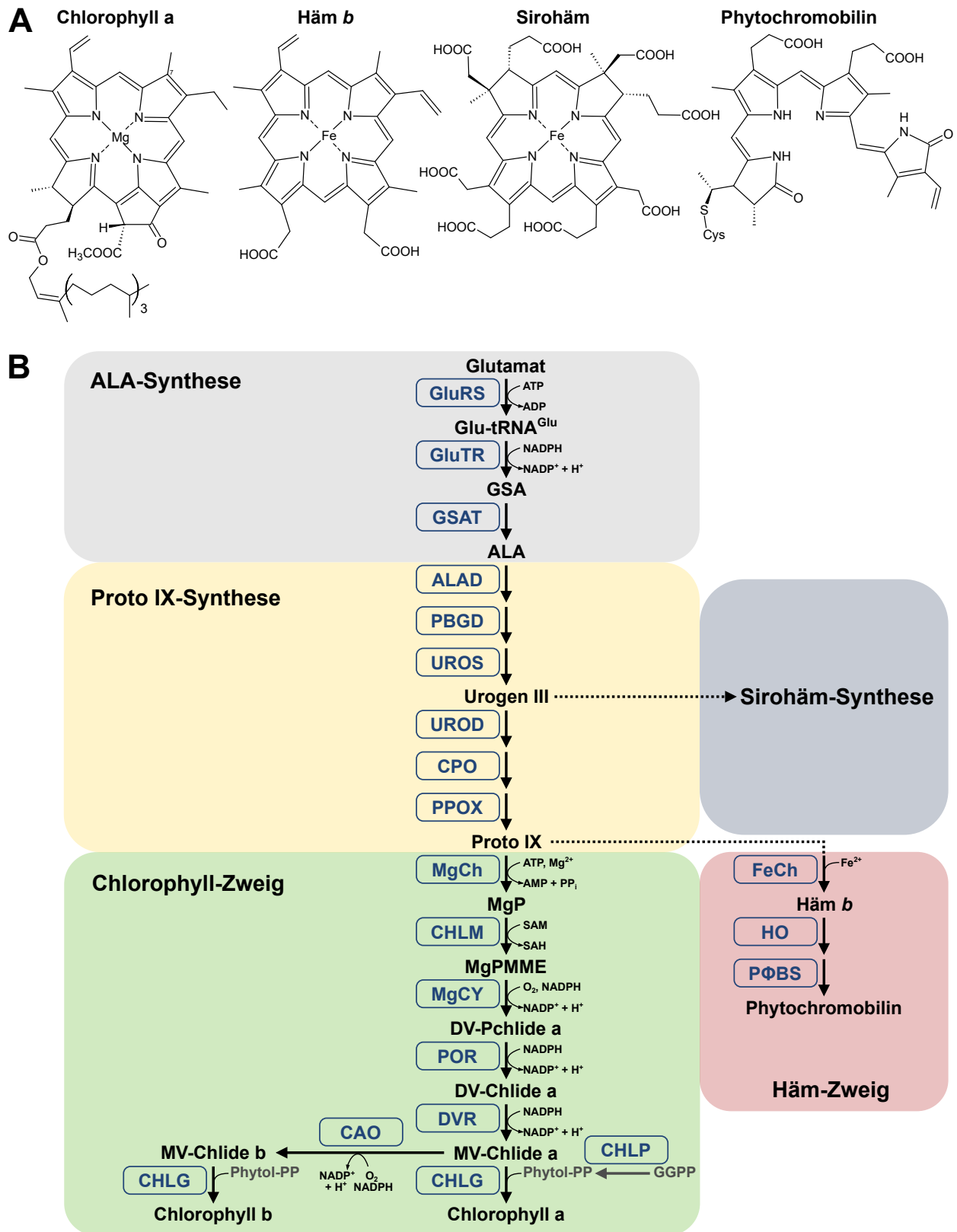


Abbildung 1.3: Tetrapyrrolbiosynthese höherer Pflanzen und ihre Endprodukte. A, Strukturformeln der vier Endprodukte der Tetrapyrrolbiosynthese Chlorophyll a, Häm b, Sirohäm und Phytochromobilin (PΦB). B, Enzymschritte der Tetrapyrrolbiosynthese ausgehend vom Glutamat bis zum Chlorophyll/Häm bzw. PΦB. Die einzelnen Abschnitte der Synthese sind farblich hinterlegt, die Abkürzungen der Enzyme bzw. der Zwischenprodukte sind im Fließtext erläutert.

1.2.2 Synthese von Protoporphyrin IX

Der Synthese von ALA folgen Kondensationsreaktionen, infolge derer acht Moleküle ALA zu einem heterozyklischen Molekül umgesetzt werden. Zwei ALA-Moleküle werden zunächst durch das Enzym ALA-Dehydratase (ALAD) asymmetrisch zu Porphobilinogen (PBG) kondensiert (KACZOR *et al.* 1994). Anschließend werden vier Moleküle PBG unter Abspaltung von vier Molekülen NH_4^+ von der PBG-Deaminase zu Hydroxymethylbilan (HMB) kondensiert (WILLIAMS *et al.* 1981), welches dann von der Uroporphyrinogen III Synthase (UROS) zu Uroporphyrinogen III (Urogen III) zyklisiert wird (TAN *et al.* 2008). Urogen III wird zum Teil in den Sirohäm-Syntheseweg abgezweigt. Hierbei findet eine Modifikation der Seitengruppen und abschließende Insertion von Fe^{2+} durch die Sirohäm-Ferrochelatase statt (TANAKA *et al.* 2007). Die weitere Umsetzung von Urogen III in Richtung Proto IX läuft über eine viermalige Decarboxylierung von Urogen III zu Coproporphyrinogen III (Copro III, katalysiert von der Urogen III-Decarboxylase, UROD, Mock *et al.* 1995), eine oxidative Decarboxylierung von Copro III zu Protoporphyrinogen IX (Protogen IX) durch die Copro III-Oxidase (CPO, MADSEN *et al.* 1993) und die finale Oxidation von Protogen IX zu Proto IX (Protogen IX-Oxidase, PPOX, KOCH *et al.* 2004) ab.

1.2.3 Häm-Synthese

Durch Insertion eines Fe^{2+} -Ions in den Ring von Proto IX entsteht Protohäm (Häm *b*). Dafür zuständig ist das Enzym Ferrochelatase (FeCh, SMITH *et al.* 1994; CHOW *et al.* 1998), welches im Gegensatz zur Magnesium-Chelatase (MgCh, s.u.) nur eine Untereinheit besitzt und ohne Cofaktoren auskommt. Mit diesem einzelnen Enzymschritt ist die Häm-Synthese bereits abgeschlossen. Häm kann aber in einer oxidativen Ringöffnung durch die Häm-Oxygenase (HO) zu Biliverdin IX α (DAVIS *et al.* 1999) und durch weitere Fd-abhängige Reduktion zu P Φ B umgesetzt werden (P Φ B-Synthase, KOHCHI *et al.* 2001). Obwohl Einigkeit darüber besteht, dass die Häm-Synthese grundsätzlich im Plastiden abläuft, wurde über Möglichkeit einer dualen Lokalisation des FeCh 1-vermittelten terminalen Häm-Synthese-Schrittes in Plastiden sowie Mitochondrien kontrovers diskutiert.

1.2.4 Chlorophyll-Synthese

1.2.4.1 Von Protoporphyrin IX zum Protochlorophyllid

Ausgehend von Proto IX wird Chl über den sogenannten Magnesium-Zweig der TP-BS gebildet. Dieser beginnt analog zur Häm-Synthese mit der Insertion eines Mg^{2+} -Ions in den Ring von Proto IX. Im Gegensatz zur FeCh ist die MgCh allerdings ein großer Multi-Untereinheiten-Enzymkomplex bestehend aus einem jeweiligen Hexamer der Untereinheiten CHLD und CHLI sowie einer CHLH-Untereinheit (WALKER *et al.* 1997). Zudem benötigt die Insertion des Mg^{2+} -Ions Energie in Form von ATP. Das Porphyrin-bindende (VERDECIA *et al.* 2005) und mit der CHLH-Untereinheit interagierende GENOME UNCOUPLED 4 (GUN4)-Protein (LARKIN *et al.* 2003) hat einen stimulierenden Effekt auf die MgCh-Aktivität und unterliegt wie die gesamte MgCh einer komplexen Kontrolle (PETER *et al.* 2009; RICHTER *et al.* 2016b). Eine stringente Regulation des Flusses von Proto IX

in den Häm- bzw. Chl-Zweig ist von Bedeutung, um den unterschiedlichen Bedarf an beiden Endprodukten im Licht bzw. in der Dunkelheit zu gewährleisten.

Als Resultat der MgCh-Reaktion entsteht Mg-Protoporphyrin IX (MgP). Die Mg-Proto IX Methyltransferase (MgMT oder CHLM) verestert im Folgenden eine der beiden Propionat-Seitengruppen von MgP mit einer Methylgruppe, die vom Methylgruppen-Donor S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) stammt (BLOCK *et al.* 2002). Es entsteht der Mg-Proto IX-Monomethylester (MgPMME), welcher in einer oxidativen Zyklisierungsreaktion unter Einsatz von molekularem Sauerstoff zu Divinyl-Protochlorophyllid a (DV-Pchlid) umgesetzt wird (MgPMME-Zyklase, MgCY, TOTTEY *et al.* (2003)). Der nachfolgende Enzymschritt, die Reduktion von Pchlid zu Divinyl-Chlorophyllid a (DV-Chlid), ist besonders kritisch, da er in Angiospermen nur im Licht ablaufen kann: Das Enzym, die lichtabhängige POR bedarf für die Katalyse der Absorption eines Photons durch das Substrat der Reaktion (ARONSSON *et al.* 2003; HEYES *et al.* 2005). Eine weitere, lichtunabhängige Form der POR (DPOR) findet man mit Ausnahme der Angiospermen in fast allen photosynthetischen Organismen, was diesen die Synthese von Chl in der Dunkelheit ermöglicht (FUJITA *et al.* 2000). Angiospermen sind infolgedessen darauf angewiesen, den Fluss durch die TP-BS in der Dunkelheit stark zu verringern, da sonst bei einsetzender Belichtung phototoxisch wirkendes Pchlid akkumulieren würde, wie es z. B. in der *flu*-Mutante der Fall ist (MESKAUSKIENE *et al.* 2001).

1.2.4.2 Die NADPH-Protochlorophyllid-Oxidoreduktase

In *Arabidopsis* existieren drei Isoformen von POR (PORA-C), welche differentiell reguliert sind und unterschiedliche Funktionen besitzen: Während in etioliertem Gewebe mRNAs und große Mengen an PORA und PORB-Proteinen nachgewiesen werden können, verschwindet die PORA-mRNA sowie das PORA-Protein bei einsetzender Belichtung innerhalb weniger Stunden (ARMSTRONG *et al.* 1995). PORB wird als die hauptsächliche Isoform in photosynthetisch aktivem Gewebe angesehen, wobei die PORC-Expression grundsätzlich bei Belichtung zunimmt und PORC wie PORB in photosynthetisch aktivem Gewebe exprimiert wird (OOSAWA *et al.* 2000). PORC kann die PORB-Funktion ersetzen (OOSAWA *et al.* 2000). Der Verlust von sowohl PORB als auch PORC führt konsequenterweise zum Absterben nach der Keimung (FRICK *et al.* 2003). Gegenüber PORB hat PORC vermutlich besondere Bedeutung unter Starklicht-Bedingungen (MASUDA *et al.* 2003).

Etioplasten, die Plastiden aus etioliertem Gewebe, enthalten große Mengen an Pchlid sowie PORA und PORB-Proteinen. Diese sind zusammen mit Lipiden in einem hochgeordneten Netzwerk, dem Prolamellarkörper (PLB), organisiert (SUNDQVIST *et al.* 1997; FRANCK *et al.* 2000; SELSTAM *et al.* 2007). In diesem bildet POR zusammen mit seinen Substraten Pchlid und NADPH einen ternären Komplex (OLIVER *et al.* 1982). Teil des PLB ist auch das *Light-harvesting like 3* (LIL3)-Protein (Abschnitt 1.3.2.4), welches mit POR interagiert und während der Deetiolierung neu gebildetes Chl bindet (MORK-JANSSON *et al.* 2015b).

Aufgrund der Hydrophobizität der späteren Intermediate der TP-BS sind diese ab Proto IX innerhalb der Thylakoidmembran lokalisiert (TANAKA *et al.* 2011). Entsprechend sind die späten Enzyme der TP-BS ebenfalls an der Membran zu finden, wobei POR selbst keine Transmembranhelix (TMH) besitzt, sondern stromal peripher mit der Membran assoziiert ist (ARONSSON *et al.* 2001).

1.2.4.3 Synthese von Chlorophyll a und b

Die letzte Modifikation des Porphyrinrings ist die NADPH-abhängige Reduktion der 8-Vinylgruppe von DV-Chlid zur Ethylgruppe durch die Divinyl-Reduktase (DVR, NAKANISHI *et al.* 2005). Dabei wird Monovinyl-Chlorophyllid a (MV-Chlid bzw. vereinfacht Chlid) gebildet. Obwohl die Umsetzung von DV-Chlid zu Chlid mittlerweile als Hauptsyntheseweg angesehen wird (NAGATA *et al.* 2007; TANAKA *et al.* 2011), ist die umgekehrte Reihenfolge der DVR und POR-Aktivitäten, d.h. die Reaktion von DV-Pchlid zu MV-Pchlid durch die DVR, gefolgt von der Umsetzung zu MV-Chlid durch POR durchaus möglich. In etioliertem Gewebe konnte entsprechend auch eine Akkumulation von MV-Pchlid nachgewiesen werden (NAGATA *et al.* 2007). Allerdings scheint die Verarbeitung von DV-Chlid durch die DVR deutlich schneller abzulaufen als die von DV-Pchlid (WANG *et al.* 2010).

In der Chl a-Synthese folgt als letzter Schritt die Veresterung von Chlid mit Phytol-Pyrophosphat (Phytol-PP) durch die Chl-Synthase (CHLG oder CHS, OSTER *et al.* 1997). Phytol-PP wird von der Geranylgeranyl-Reduktase (CHLP oder GGR, TANAKA *et al.* 1999) bereitgestellt, und durch die schrittweise Reduktion von insgesamt drei Doppelbindungen aus Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) gebildet. Hierbei ist beachtenswert, dass CHLG ebenfalls GGPP sowie die Zwischenprodukte der CHLP-Reaktion DHGG-Pyrophosphat und THGG-Pyrophosphat als Substrate akzeptiert (OSTER *et al.* 1997). Die Stabilität sowie vermutlich auch die Membranverankerung von CHLP basiert auf der Interaktion zu LIL3 (TANAKA *et al.* 2010; TAKAHASHI *et al.* 2014). Konsequenterweise akkumuliert eine *lil3.1/3.2*-Doppelmutante infolge einer Destabilisierung von CHLP geranyliertes Chl (Chl_{GG}, TANAKA *et al.* 2010, siehe Abschnitt 1.3.2.4). Da Phytol-PP auch eine Vorstufe der Tocopherol-Synthese ist, besitzen die entsprechenden Mutanten deutlich verringerte Tocopherol-Gehalte.

Wie beschrieben benötigen Pflanzen neben Chl a auch Chl b als Pigment in den Antennenkomplexen. Die Synthese von Chl b verläuft dabei im Wesentlichen über Chlid a, welches von der Chlorophyllid a-Oxygenase (CAO) zu Chlid b oxidiert wird (ESPINEDA *et al.* 1999). Anschließend wird Chlid b von CHLG mit Phytol-PP zu Chl b verestert (OSTER *et al.* 1997).

1.2.5 Regulationsmechanismen der Tetrapyrrolbiosynthese

Die TP-BS unterliegt einer vielschichtigen, komplexen Kontrolle, deren Ziel neben der ausbalancierten Synthese der unterschiedlichen Endprodukte vor allem die Vermeidung einer unkontrollierten Akkumulation von Zwischenprodukten ist. Diese sind wie das Endprodukt Chl zur Lichtabsorption in der Lage und können durch unspezifische Weitergabe der Anregungsenergie unter anderem phototoxisch wirkende, reaktive Sauerstoffspezies bilden. Neben einer grundsätzlichen transkriptionalen Kontrolle – z. B. in Relation zum Entwicklungszustand und als Reaktion auf Lichtperzeption sowie abiotische und biotische Stressfaktoren – existieren umfangreiche posttranslationale Regulationsmechanismen (TANAKA *et al.* 2011). Erwähnenswert im Rahmen der transkriptionalen Kontrolle ist, dass wie oben angedeutet für viele der TP-BS-Enzyme verschiedene Isoformen existieren (z. B. GluTR1/2, GSA1/2, CHLI1/2, PORA-C, FeCh1/2), deren Gene differentiell reguliert exprimiert werden.

Mechanismen der posttranslationalen Kontrolle bestehen unter anderem in der Bildung von (stabilisierenden bzw. aktivierenden/inhibierenden) Proteinkomplexen, Reaktion auf den Redoxstatus durch die Reduktion mittels der plastidenlokalisierten Thioredoxine (Trx) und die NADPH-abhängige Thioredoxin Reduktase C (NTRC), der Phosphorylierung/Acetylierung (und anderen posttranslationalen Proteinmodifikationen) sowie der proteolytischen Degradation (TANAKA *et al.* 2011; BRZEZOWSKI *et al.* 2015). Die Charakterisierung der posttranslationalen Regulation der TP-BS ist bei weitem noch nicht abgeschlossen und wird laufend durch neue Erkenntnisse erweitert. Deswegen folgt hier nur eine kurze Übersicht der wichtigsten Mechanismen.

1.2.5.1 Kontrolle der ALA-Biosynthese

Da wie oben dargelegt die ALA-Synthese ratenlimitierend für die TP-BS ist und in der Dunkelheit abgeschaltet werden muss, um die Anreicherung von Pchlid zu verhindern, greift eine Vielzahl an Mechanismen an diesem Schritt an. Insbesondere betrifft dies die Kontrolle der GluTR-Aktivität: Die GluTR kann über das FLU-Protein (MESKAUSKIENE *et al.* 2001) vom Stroma an die Thylakoidmembran transferiert und dadurch inaktiviert werden (SCHMIED *et al.* 2018). In der *flu*-Mutante ist die GluTR daher fast vollständig Stroma-lokalisiert, was zur Produktion großer Mengen an Pchlid im Dunkeln und entsprechend großem oxidativem Stress bei Belichtung führt (SCHMIED *et al.* 2018). Eine differentielle Regulation der beiden GluTR-Isoformen drückt sich auch darin aus, dass FLU nur GluTR1 nicht aber GluTR2 bindet (MESKAUSKIENE *et al.* 2002). Die Inaktivierung der GluTR durch FLU im Dunkeln beinhaltet die Bildung eines Inaktivierungskomplexes, dem neben FLU und GluTR auch POR und CHL27 (eine Untereinheit der MgCY) angehören. Der Komplex bindet vermutlich auch Pchlid (KAUSS *et al.* 2012).

Das GBP interagiert ebenfalls mit der GluTR (CZARNECKI *et al.* 2011) und besitzt mindestens unter *in vitro*-Bedingungen einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität der GluTR (ZHAO *et al.* 2014). Es wird vermutet, dass über die Bindung an GBP und dessen Membranassoziation über einen bislang unbekannten Bindungspartner eine kleine Menge an GluTR auch in der Dunkelheit aktiv gehalten wird, um den fortlaufenden Bedarf an ALA für die Häm-Synthese sicherzustellen (CZARNECKI *et al.* 2011; APITZ *et al.* 2016). GluTR konnte außerdem als Substrat des Clp-Protease-Systems bestätigt werden, wobei GBP einen schützenden Einfluss auf den proteolytischen Abbau der GluTR in Dunkelheit ausübt (NISHIMURA *et al.* 2013; APITZ *et al.* 2016). Zudem konnte eine Chaperonfunktion von cpSRP43 gegenüber der GluTR nachgewiesen werden: Indem cpSRP43 den N-terminalen Bereich der GluTR bindet, welcher zwei zur Aggregation neigende Peptidabschnitte besitzt, wird eine Aggregation der GluTR verhindert (WANG *et al.* 2018).

1.2.5.2 Regulation über den Redoxstatus

Die lichtabhängigen Elektronentransportprozesse der Photosynthese führen u.a. zur Bildung von reduziertem Fd sowie von NADPH im Chloroplastenstroma (vgl. Abschnitt 1.1) und schaffen dort somit eine reduzierende Umgebung. Gleichzeitig wird das Thylakoidlumen oxidiert (BUCHANAN

et al. 2005; KANG *et al.* 2016). Über die Fd-Trx-Reduktase kann reduziertes Trx gebildet werden, welches dann wiederum Reduktionsäquivalente auf Zielproteine übertragen kann. Die verschiedenen Trx-Varianten im Chloroplasten (u.a. Trx *f*, *m*, *x* und *y*) wirken auf eine Vielzahl von Zielproteinen und molekularen Prozessen ein, wie den Kohlenstoffmetabolismus, Proteinfaltung und -abbau sowie auch die TP-BS (LEMAIRE *et al.* 2007). Interaktionen (und damit auch putative Regulationsmechanismen) des Trx-Systems mit Enzymen der TP-BS betreffen u.a. GluTR, GSAT, ALAD, PPOX und MgCh (BRZEZOWSKI *et al.* 2015; DA *et al.* 2017). Ziel der Trx-Interaktion ist die reduktive Öffnung von Disulfidbrücken, was in der Regel zu einer Aktivierung der Zielproteine führt.

Neben dem Trx-System liegt auch NTRC in Chloroplasten vor (SERRATO *et al.* 2004). NTRC nutzt NADPH, um seine Protein-eigene Trx-Domäne zu reduzieren. Anschließend können Zielproteine reduziert werden. Durch die Nutzung von NADPH ist NTRC nicht direkt auf den Erhalt von Elektronen aus der photosynthetischen Elektronentransportkette angewiesen. NTRC ist wie die Trx-Proteine für eine Vielzahl an plastidären Prozessen relevant, so z. B. für die Regulation der Stärkesynthese (MICHALSKA *et al.* 2009). Interaktionen von NTRC mit Enzymen der TP-BS wurden u.a. für GluTR und CHLM beschrieben (RICHTER *et al.* 2013), und in der *ntrc*-Mutante wurden eine verringerte ALA-Syntheserate sowie eine niedrigere CHLM-Aktivität beobachtet. Für CHLM konnte gezeigt werden, dass das Erreichen der maximalen Enzymaktivität die Reduktion einer intramolekulare Disulfidbrücke voraussetzt (RICHTER *et al.* 2016a).

1.2.5.3 Kontrolle durch posttranslationale Modifikationen

Zu den Varianten posttranslationaler Modifikationen von Proteinen gehört die Veränderung von Aminosäureseitenketten durch Bindung funktioneller Gruppen bzw. kleiner Moleküle. In Chloroplasten wurde unter anderem Glykosylierung, N-Acetylierung, Methylierung, Nitrosylierung und Phosphorylierung beschrieben (LEHTIMÄKI *et al.* 2015), wobei die funktionelle Charakterisierung dieser Modifikationen in vielen Fällen noch am Anfang steht. Phosphorylierung, d.h. die reversible Übertragung einer Phosphatgruppe auf Serin bzw. Threonin (oder auch Tyrosin, Aspartat bzw. Histidin), ist dabei bisher am intensivsten analysiert und charakterisiert worden (LEHTIMÄKI *et al.* 2015). Wichtige Ziele von Phosphorylierungen im Chloroplasten sind, soweit sie bisher beschrieben wurden, die LHCII-Komplexe während des *State Transition*-Prozesses (d.h. der Migration von LHCII von PSII zu PSI für eine ausbalancierte Verteilung der Anregungsenergie) sowie die PSII-Untereinheiten D1, D2 und CP43 während des Reparaturzyklus von PSII (ALLEN *et al.* 1981; ARO *et al.* 1993).

Hochdurchsatz-Screenings (HEAZLEWOOD *et al.* 2008, und weitere) ergaben für Enzyme der TP-BS Phosphopeptide von PPOX1, CHLH, CHLI, GUN4 und PORB (BRZEZOWSKI *et al.* 2015). Für GUN4 konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierte Variante einen verringerten stimulatorischen Einfluss auf die MgCh-Aktivität ausübt und die Phosphorylierung von GUN4 somit vermutlich als Mechanismus zur Herunterregulation des Flusses von Intermediaten durch den Chl-Zweig der TP-BS in der Nachtphase dient (RICHTER *et al.* 2016b).

1.3 Die LHC-Proteinfamilie

Die LHC-Proteinfamilie beinhaltet 1-Helix bis 4-Helix-Proteine (wobei die entsprechenden Helices Transmembranhelices (TMHs) sind). Ein bis zwei der TMHs jedes Vertreters der LHC-Familie besitzen ein konserviertes Chl-Bindemotiv (LHC-Motiv, siehe Abschnitt 1.3.4). Topologisch gesehen enthalten immer Helix 1 und 3 (wenn vorhanden) das LHC-Motiv (Abb. 1.4 A). Die für die LHC-Proteinfamilie namensgebenden LHC (*Light-harvesting complex*)-Proteine (LHCPs) besitzen drei TMHs, ebenso wie die *Early-light inducible proteins* (ELIPs). Der einzige 4-Helix-Vertreter ist die S-Untereinheit von PSII (PsbS); die 2-Helix-Vertreter werden *Stress-enhanced proteins* (SEPs) genannt. Weiterhin gehören 1-Helix-Proteine, *One-helix proteins* (OHPs) zur LHC-Familie (Abb. 1.4 A). Diese Diversität in höheren Pflanzen findet sich allerdings nicht in Cyanobakterien, welche ausschließlich 1-Helix-Proteine, die *High-light inducible proteins* (Hlips oder *Small CAB-like proteins*, SCPs), besitzen.

Es werden ferner verschiedene Untergruppen unterschieden (LHCA1-6, LHCB1-7, ELIP1-2, SEP1-3 und OHP1-2), und jedes der Proteine der verschiedenen Untergruppen (wohl mit Ausnahme von PsbS) kann grundsätzlich durch mehrere Gene codiert werden (ELIPs, SEP1-2, OHPs) bzw. wird dies auch regelmäßig (LHCPs, SEP3) (KLIMMEK *et al.* 2006). Dabei ist *Arabidopsis* mit insgesamt vermutlich 32 Genen (7x LHCA, 16x LHCB, 1x PsbS, 1x ELIP1, 1x ELIP2, 1x SEP1, 1x SEP2, 2x SEP3/LIL3, 1x OHP1 und 1x OHP2) im Gegensatz zu anderen höheren Pflanzen wie *Populus* spp. (mit derzeit 39 bekannten Genen) vergleichsweise sparsam ausgestattet (KLIMMEK *et al.* 2006).

Eine detaillierte phylogenetische Analyse von Primärstrukturen (d.h. Aminosäuresequenzen) und Sekundärstrukturen von Proteinen der LHC-Familie durch ENGELKEN *et al.* (2010) führte zu folgendem Modell der Evolution: Die cyanobakteriellen Hlips sind der universale evolutionäre Vorläufer, von dem direkt der eukaryotische OHP1-Typ abstammt. Bereits im gemeinsamen Vorfahren der Pflanzen entstand aus dem OHP1-Typ vermutlich eine Vielzahl an unterschiedlichen 2-Helix SEPs. Die LHCPs und PsbS entwickelten sich dann aus unterschiedlichen SEPs (und nicht aus den Hlips wie früher vermutet) durch unabhängige Genduplikationen (und Verlust einer Helix im Fall der LHCPs). Ähnliches gilt für die ELIPs, welche nach diesem Modell weder die Vorfahren der LHCPs noch von PsbS darstellen. Der OHP2-Typ entwickelte sich nach ENGELKEN *et al.* (2010) entweder aus OHP1 oder ebenfalls aus einem weiteren SEP-Typ.

1.3.1 LHC-Proteine (LHCPs)

Die LHCPs bilden die Haupt- und Nebenantennen der Photosysteme (*major/minor antennae*), welche an die Reaktionszentren der Photosysteme gekoppelt sind. *Arabidopsis* besitzt sechs LHCA- und sieben LHCB-Proteintypen, wobei LHCA-Proteine grundsätzlich mit PSI assoziiert sind, während die LHCB-Proteine die PSII-Antenne bilden. (Hierbei sollte angemerkt werden, dass z.T. mehrere Gene eine einzige LHC-Proteinvariante codieren. So liegen z. B. in *Arabidopsis* 5 Gene für LHCB1 vor.) Verschieden stark an PSII gebundene Homo- und Heterotrimere von LHCB1-3 (stark/mittel/locker gebunden, S/M/L) bilden die Hauptantennen von PSII (LHCII), monomere LHCB4-6-Proteine (bzw. CP29/26/24) die Nebenantennen (BOEKEMA *et al.* 1999) (Abb. 1.4 B). Am PSI dagegen sind die monomeren LHCA1-4-Proteine in der Anordnung LHCA1-4-2-3 ange-dockt (LHCI) (BEN-SHEM *et al.* 2003). Ein phosphoryliertes LHCII-Trimer kann im Rahmen des

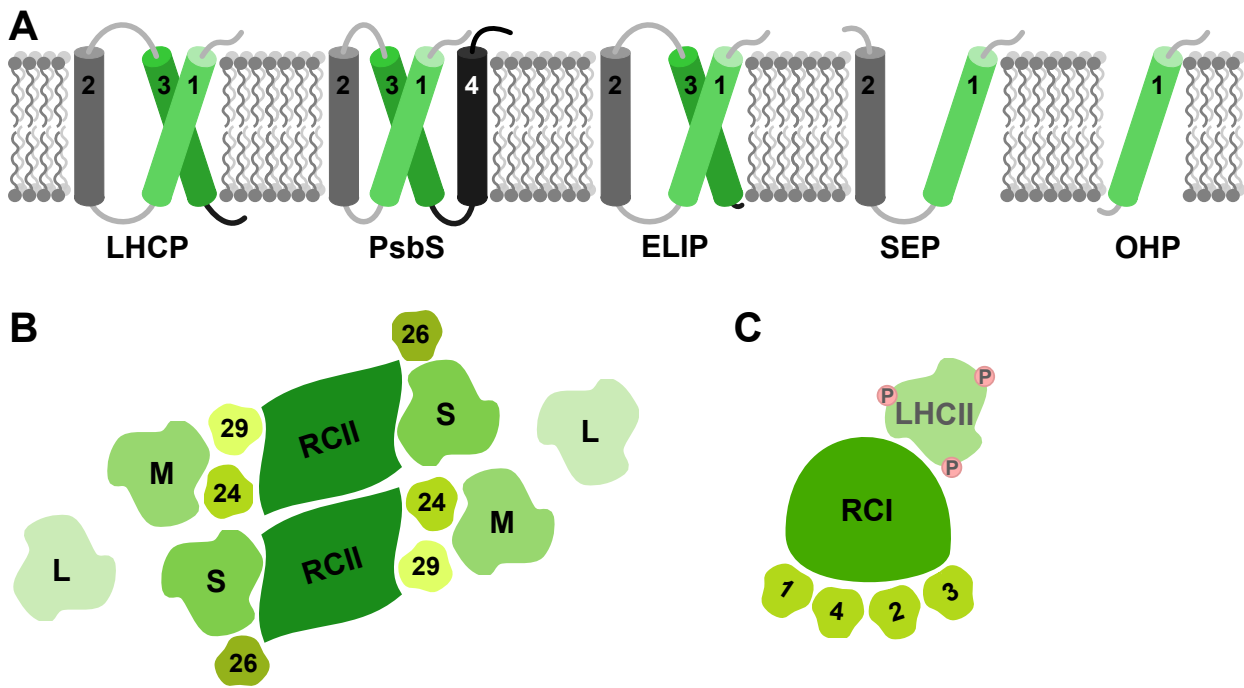


Abbildung 1.4: Die Proteine der LHC-Familie und die Antennensysteme der Photosysteme. A, Topologien der verschiedenen Vertreter der LHC-Familie. Die Zahlen geben die Nummerierung der Helices an. Helix 1 & 3 der LHCPs, ELIPs und von PsbS enthalten das charakteristische LHC-Motiv, zudem Helix 1 der SEPs und die einzige Helix der OHPs (in grün gekennzeichnet). B, Aufbau der Haupt- und Nebenantennen von PSII. S, M und L bezeichnen die unterschiedlich stark gebundenen Hauptantennen von PSII (LHCII). Die Zahlen 24, 26, und 29 repräsentieren die monomeren Nebenantennen-Proteine CP24/26/29. Die Reaktionszentren sind mit RCII bezeichnet. Die Position der L-Trimere ist variabel. C, Anordnung der Antennen von PSI. Die Zahlen 1-4 bezeichnen die LHCA1-4-Proteine. LHCII-P markiert ein phosphoryliertes Trimer, das im Rahmen der *State Transition* an PSI gebunden hat.

State Transition-Prozesses zusätzlich an der zu LHCI gegenüberliegenden Seite von PSI andocken (Abb. 1.4 C). LHCA5 und 6 sind an der Interaktion von PSI mit dem NDH-Komplex beteiligt, und damit für den Aufbau des PSI-NDH-Superkomplexes relevant (PENG *et al.* 2009).

Die LHCPs binden Chl a und b sowie Carotinoide/Xanthophylle in verschiedenen Stöchiometrien (siehe Abschnitt 1.3.4). Durch die Bindung dieser zusätzlichen Pigmente mit anderen Absorptionseigenschaften im Vergleich zum ausschließlichen Chl a der Reaktionszentren wird ein größerer spektraler Bereich abgedeckt. Dies begünstigt die LHCPs in ihrer Funktion als Lichtsammelproteine für PSI und PSII. Neben dieser Antennenfunktion besitzen die LHCPs noch weitere Eigenschaften: Die Bindung insbesondere der Xanthophylle ist Teil des Schutzmechanismus' von PSII, dem NPQ. NPQ ist ein multifaktorieller Prozess, wobei die Energie-abhängige Komponente (qE) auf der Dissipation von überschüssiger Anregungsenergie mittels LHCP-gebundener Zeaxanthin-Moleküle beruht. Die Funktion von PsbS (s.u.) gehört ebenfalls zum qE-Anteil des NPQ. Durch die Migration von phosphorylierten LHCII-Komplexen von PSII zu PSI kann die durch Lichtabsorption erzeugte Anregungsenergie zwischen beiden Photosystemen ausbalanciert werden (*State Transition*). Die dadurch bedingte Verkleinerung der PSII-Antenne und die gleichzeitige Vergrößerung der PSI-Antenne erhöhen den Elektronenfluss durch PSI relativ zu dem des PSII, was zu einer Entlastung (d.h. einer verringerten Reduktion) des Plastochinonpools führt, und damit zum Schutz des PSII vor Photooxidation beiträgt. *State Transition* wird auch als qT-Anteil des NPQ bezeichnet. Zuletzt ist die Interaktion von LHCPs innerhalb der Membran, aber auch zwischen den Membranschichten der Grana-Stapel für die Organisation der Thylakoidmembran von Bedeutung (BÜCHEL 2015).

Strukturell zeichnen sich die LHCPs durch den Besitz von drei TMHs aus, wovon Helix 1 und 3 das charakteristische LHC-Motiv aufweisen. Die beiden Helices sind X-förmig in der Membran angeordnet, wobei diese Struktur durch interagierende Aminosäuren beider Helices stabilisiert wird (KÜHLBRANDT *et al.* 1994). Um diese beiden Helices sowie im Raum zwischen Helix 2 und den Helices 1 & 3 sind die Pigmente gebunden (KÜHLBRANDT *et al.* 1994; LIU *et al.* 2004).

1.3.2 PsbS und die LIL-Proteine

Neben den LHCPs umfasst die LHC-Proteinfamilie noch das PsbS-Protein sowie die *Light-harvesting like* (LIL)-Proteine, zu denen die ELIPs, SEPs und OHPs gehören.

1.3.2.1 PsbS

PsbS unterscheidet sich von den anderen Proteinen der LHC-Familie, da es der einzige Vertreter mit vier TMHs ist (Abb. 1.4 A). Davon enthalten Helix 1 und 3 das charakteristische LHC-Motiv, und wichtige Aminosäuren wie das Glutamat und Arginin im Chl-Bindemotiv (ExxxxR, s.u.) sind wie in allen anderen Vertretern konserviert (ENGELKEN *et al.* 2010). PsbS bedarf jedoch zur Stabilisierung im Gegenteil zu den LHCPs nicht der Bindung von Pigmenten (WILK *et al.* 2013), und die in den LHCPs an der Chl-Bindung beteiligten, konservierten Glutamat-Reste in Helix 1 und 3 können aufgrund sterischer Hinderung durch Helix 2 und 4 keine Interaktion zu Chl-Molekülen aufnehmen (FAN *et al.* 2015): Im Gegensatz zu den LHCPs sind die Helices im PsbS-Protein sämtlich dicht gepackt und lassen keinen Raum für die proteininterne Assemblierung von Pigmenten (FAN *et al.* 2015).

Im Rahmen des qE-Anteils des NPQ funktioniert PsbS als pH-Sensor im Thylakoidlumen (Li *et al.* 2000). Die Protonierung zweier Glutamatreste (122 und 226 in AtPsbS) führt zu einer Konformationsänderung von PsbS und dadurch zur Aktivierung von qE (Li *et al.* 2004). PsbS ist daher essentiell für eine schnelle und effektive Aktivierung von qE, obgleich auch *psbs*-Mutanten (*npq4*) nicht durch völlige Abwesenheit von photoprotektiver Energiedissipation gekennzeichnet sind (JOHNSON *et al.* 2010). Der eigentliche Ort von qE sind nach Aktivierung durch PsbS die LHCII-Komplexe (FAN *et al.* 2015), was mit einer bevorzugten Interaktion von PsbS mit LHCII im Licht korreliert (CORREA-GALVIS *et al.* 2016).

1.3.2.2 ELIPs

Die ELIPs (je eine ELIP1- und ELIP2-Variante in *Arabidopsis*) besitzen die gleiche Membrantopologie wie die LHCPs, d.h. es handelt sich ebenfalls um 3-Helix-Proteine, bei denen Helix 1 und 3 das Chl-Bindemotiv einschließlich der konservierten Aminosäuren (ExxNxR) aufweisen (HEDDAD *et al.* 2000; ENGELKEN *et al.* 2010) (Abb. 1.4 A). ELIPs binden vermutlich Pigmente: Aus *P. sativum* nativ aufgereinigte ELIPs enthielten Chl a und Lutein, und eine *in-vitro*-Integration von ELIPs in Etioplastenmembranen war nur bei Anwesenheit von Chl a möglich (ADAMSKA *et al.* 1999; ADAMSKA *et al.* 2001).

Die *ELIP*-Transkripte sowie Proteine sind unter Normal- bzw. Schwachlicht-Bedingungen nicht detektierbar, die Expression nimmt aber im Starklicht in Abhängigkeit der Lichtstärke zu (HEDDAD *et al.* 2000; CASAZZA *et al.* 2005). Die *ELIP1*-Induktion erfolgt bereits bei geringeren Lichtstärken als die des *ELIP2*-Gens, zudem gibt es temperaturbedingte Unterschiede in der Expression: Bei 22°C im Starklicht akkumuliert im Wesentlichen *ELIP1*, während bei 4°C auch *ELIP2* angereichert wird (CASAZZA *et al.* 2005). Nicht immer korrelieren dabei die Transkript- mit den Proteinmengen, da z. B. beide *ELIP*-Transkripte bei 4°C konstitutiv exprimiert werden, während die entsprechenden Proteine erst bei erhöhter Lichtstärke und in quantitativer Abhängigkeit derselben akkumulieren (CASAZZA *et al.* 2005). Die Transkripte und Proteine sind grundsätzlich während der Deetiolierung detektierbar, verschwinden aber bereits 24h nach Beginn der Belichtung wieder (CASAZZA *et al.* 2005). Nach Beendigung eines vorausgegangenen Lichtstresses kann ein Rückgang der Expression beobachtet werden (ADAMSKA *et al.* 1992).

Die Beobachtungen führten zur Vermutung, dass die *ELIPs* besonders unter photoinhibitorischen Lichtbedingungen von Wichtigkeit sein könnten, z. B. zur Bindung von während der PSII-Reparatur freigesetzten Chl-Molekülen (HUTIN *et al.* 2003). Allerdings wies eine *elip1/elip2*-Doppelmutante unter Lichtstress wenigstens in adulten Pflanzen keine erhöhte Sensitivität hinsichtlich Photooxidation auf (ROSSINI *et al.* 2006). Eine mögliche alternative Funktion von *ELIP2* als Chl-Sensor und Mediator der Chl-Biosynthese wurde infolge der Analyse von *ELIP2*-Überexpressionslinien diskutiert, welche eine reduzierte ALA-Syntheserate und verringerte MgCh-Aktivität zeigten (TZVETKOVA-CHEVOLLEAU *et al.* 2007).

1.3.2.3 SEP1/2

In *Arabidopsis* existieren insgesamt vier SEPs: SEP1 und 2 sowie die beiden SEP3-Isoformen, die auch als LIL3.1 und LIL3.2 bezeichnet werden (s.u.). Die SEPs sind hinsichtlich ihrer Membrantopologie 2-Helix-Proteine (Abb. 1.4 A), wobei Helix 1 das Chl-Bindemotiv beinhaltet, welches im Fall von SEP1/2 nur teilweise die konservierten Aminosäuren enthält ($^1D/^2E \times \times \times R$, die Zahlen beziehen sich auf SEP1 bzw. 2) (HEDDAD *et al.* 2000; ENGELKEN *et al.* 2010). Gegenüber den *ELIPs* werden *SEP1* und *SEP2* bereits unter Schwachlicht exprimiert, die Genexpression steigt aber ebenso unter Starklicht an. Weiterhin reagiert die Expression positiv auf andere abiotische Stressfaktoren wie UV-A und Kältestress (HEDDAD *et al.* 2000). Zur genauen Funktion von SEP1/2 ist weiter nichts bekannt.

1.3.2.4 SEP3/LIL3

Die *LIL3*-Gene werden bereits in frühen Entwicklungsstadien exprimiert und zeigen eine hohe konstitutive Transkriptakkumulation in photosynthetisch aktivem Gewebe (LOHSCHIEDER *et al.* 2015). Auf Lichtstress reagiert vor allem *LIL3.1*, dabei ist aber erst bei sehr hohen Lichtstärken eine merkliche Zunahme von *LIL3.1* nachweisbar. Die *LIL3.2*-Expression bleibt im Starklicht weitestgehend konstant (LOHSCHIEDER *et al.* 2015). Beide Proteinlevel bleiben bei kurzzeitiger Starklicht-Exposition zunächst unverändert, *LIL3.2* wird bei längerer Exposition destabilisiert (LOHSCHIEDER *et al.* 2015).

LIL3 akkumuliert wie POR in etioliertem Gewebe und bildet während der Deetiolierung Chl-bindende, fluoreszierende Komplexe (REISINGER *et al.* 2008). Die Autoren schlugen deshalb eine Chl-Speicher/Transferfunktion für LIL3 während der Deetiolierung vor (REISINGER *et al.* 2008). Es konnte zudem gezeigt werden, dass beide LIL3-Isoformen aus *Arabidopsis* Heterodimere bilden (TAKAHASHI *et al.* 2014). Aufgrund von in *in vitro*-Interaktionsstudien bestimmten K_D -Werten wird vermutet, dass die Heterodimerisierung der Chl-Bindung vorausgeht (MORK-JANSSON *et al.* 2015a). Eine *in vitro*-Rekonstitution war ausschließlich mit Chl a, nicht aber mit Chl b möglich (MORK-JANSSON *et al.* 2018). Beide LIL3-Isoformen enthalten in ihrer Helix 1 gegenüber SEP1/2 vollständig die konservierten Aminosäuren (ExxNxR) (ENGELKEN *et al.* 2010).

Neben der Heterodimerisierung beider Isoformen konnte die Interaktion von LIL3 zu POR, CHLG und CHLP gezeigt werden (TANAKA *et al.* 2010; MORK-JANSSON *et al.* 2015b), wobei sich die Interaktion zu CHLP als von besonderer Bedeutung herausstellte: Während *lil3.1* bzw. *lil3.2*-Einzelmutanten phänotypisch relativ unauffällig sind, zeichnet sich eine *lil3.1/lil3.2*-Doppelmutante durch stark beeinträchtigtes Wachstum und vor allem eine ausschließliche Akkumulation von geranylierten Chl-Spezies aus (TANAKA *et al.* 2010). Dies konnte auf eine Destabilisierung von CHLP zurückgeführt werden, wobei die CHLP-Transkripte in der Doppelmutante WT-ähnlich waren (TANAKA *et al.* 2010). Die Untersuchung von LIL3 und CHLP in Thylakoidmembranen mittels BN-PAGE ließ die Existenz eines hochmolekularen Komplexes beider Proteine vermuten. Da ein stabilisierender Einfluss von LIL3 auf CHLP als Resultat einer Membranverankerung von CHLP postuliert wurde, wurden Komplementationsexperimente mit CHLP als Fusionsprotein mit verschiedenen Transmembrandomänen (TM) durchgeführt (TAKAHASHI *et al.* 2014): Es zeigte sich, dass sowohl die Expression des Fusionsproteins CHLP-TM_{LIL3} als auch CHLP-TM_{APX} (TM der Ascorbatperoxidase, APX) im *lil3.1/lil3.2*-Hintergrund eine partielle Komplementation des Mutantenphänotyps bewirken konnte (TAKAHASHI *et al.* 2014). Insofern scheint eine entscheidende Funktion von LIL3 in der Stabilisierung von CHLP durch Membranverankerung zu bestehen.

Die Expression einer LIL3-Variante mit mutiertem Chl-Bindemotiv führte nur zu einer partiellen Komplementation (aber zu einer vollständigen Komplementation bei starker Überakkumulation des mutierten LIL3-Proteins) der *lil3.1/lil3.2*-Mutante (TAKAHASHI *et al.* 2014). Hierbei wurden zwei Aminosäuren aus dem Chl-Bindemotiv (ExxNxR) sowie ein am C-terminalen Ende der Helix 1 gelegenes Aspartat zu Alanin mutiert. Die Expression dieser LIL3-Variante führte zur Dissoziation der hochmolekularen LIL3-CHLP-Komplexe. Das Chl-Bindemotiv wurde daher als mögliche Interaktionsstelle zu CHLP postuliert. Zudem scheint eine Komplexbildung von CHLP mit LIL3 Voraussetzung für das Erreichen der optimalen CHLP-Aktivität zu sein (TAKAHASHI *et al.* 2014).

BN-PAGE-Analysen von Thylakoidmembranen zeigten eine Co-Migration beider LIL3-Isoformen mit der Nebenantenne von PSII (insbesondere LHCB5/CP26). Allerdings waren LIL3.1/LIL3.2-defiziente Pflanzen nicht in der photoprotektiven Energiedissipation beeinträchtigt (LOHSCHIEDER *et al.* 2015). Die getrennte Überexpression von *LIL3.1* bzw. *LIL3.2* führte z.T. zu einer Co-Suppression beider *LIL3*-Gene. Sowohl in Gewebeproben die eine LIL3-Überakkumulation aufwiesen, als auch in LIL3.1/LIL3.2-defizienten Blattsegmenten wurde eine Destabilisierung von TP-BS-Enzymen beobachtet (LOHSCHIEDER *et al.* 2015).

1.3.2.5 OHPs

Wie bereits der Name andeutet, handelt es sich bei den OHPs um 1-Helix-Proteine, und damit um die kleinsten Vertreter der LHC-Familie. In der Regel wird zu dieser Gruppe auch noch der C-Terminus der FeCh 2-Isoform gezählt, da dieser ebenfalls aus einer TMH mit dem Chl-Bindemotiv besteht. Bei den OHPs lassen sich zwei Typen unterscheiden: Der OHP1-Typ ähnelt den cyanobakteriellen Hlips (ENGELKEN *et al.* 2010). Die Proteine des OHP2-Typs dagegen sind im reifen Zustand knapp doppelt so groß wie die Proteine des OHP1-Typs und unterscheiden sich vor allem durch einen Prolin-reichen Abschnitt am N-Terminus des reifen Proteins (eigene Beobachtung, siehe Abb. 1.5 A, B). Beide Typen besitzen eine C-terminale TMH mit dem Chl-Bindemotiv und enthalten darin die konservierten Aminosäuren (ExxNxR).

Für *OHP1* wie *OHP2* wurde in den ursprünglichen Veröffentlichungen eine Zunahme der Expression im Starklicht beschrieben (JANSSON *et al.* 2000; ANDERSSON *et al.* 2003), wenigstens für *OHP2* wurde unter diesen Bedingungen auch eine starke Anreicherung des Proteins beobachtet. Eine nachfolgende Analyse zeigte allerdings keine wesentliche Anreicherung der Transkripte im Starklicht mehr (BECK *et al.* 2017) (was in der vorliegenden Arbeit auch bestätigt werden konnte, s.u.). Beide *OHP*-Gene werden bereits in etioliertem Gewebe exprimiert und die Expression sowie die Proteinlevel steigen bei der Deetiolierung an (BECK *et al.* 2017, eigene Beobachtung).

Eine Analyse von Thylakoidmembranen mittels BN-PAGE zeigte eine Co-Migration der OHPs mit LHCII, wobei die relative Menge der mit LHCII co-migrierenden OHPs im Starklicht zunahm (GALETSKIY *et al.* 2011). Einschränkend muss aber angemerkt werden, dass es sich bei dieser Studie ausschließlich um massenspektrometrische Nachweise von z.T. nur einzelnen Peptiden handelte. Für *OHP2* wurde infolge von Co-Migrationsstudien solubilisierter Thylakoide in Saccharosegradienten eine Assoziation zu PSI vermutet (ANDERSSON *et al.* 2003), und eine beobachtete Anreicherung von *OHP2* in der LHCII-Fraktion im Starklicht mit an PSI-gebundenen LHCII-Trimeren im Rahmen des *State Transition* in Verbindung gebracht (GALETSKIY *et al.* 2011).

Eine detailliertere Analyse der *ohp1* und *ohp2* T-DNA-Mutanten zeigte dann aber eine Destabilisierung von Kernuntereinheiten beider Photosysteme, wobei die Proteinmengen der untersuchten LHCPs im Wesentlichen unverändert blieben (Ausnahmen waren verringerte Proteinlevel von LHCA3/4 und LHCB3/6 in *ohp1*) (BECK *et al.* 2017; LI *et al.* 2018). Die homozygoten Nachkommen sowohl der *ohp1* als auch der *ohp2*-Mutante sind stark im Wachstum beeinträchtigt und nur auf MS-Medium (idealerweise unter Zugabe von Saccharose) kultivierbar (BECK *et al.* 2017). Beim Umsetzen auf Erde sterben diese Mutantpflanzen ab, bei entsprechend langer Kultivierung auf Medium gelangen sie zur Blüte und setzen Schoten an. Die darin enthaltenen Samen keimen jedoch selbst auf Saccharose-enthaltendem Medium nicht aus (MYOUGA *et al.* 2018, eigene Beobachtung).

Die Analyse der Proteingehalte in den Mutanten zeigte weiterhin eine Destabilisierung der jeweils anderen OHP-Variante trotz unveränderter Transkriptmengen. Die Überexpression der jeweils anderen Variante im Mutantenhintergrund führte nicht zu einer Komplementation, weswegen unterschiedliche Funktionen für beide Varianten vermutet wurden (BECK *et al.* 2017). Die im Zeitraum dieser Promotionsarbeit erschienenen Arbeiten von LI *et al.* (2018) und MYOUGA *et al.* (2018) zeigten (unterstützend zu eigenen Erkenntnissen, HEY *et al.* 2018a) die Interaktion von

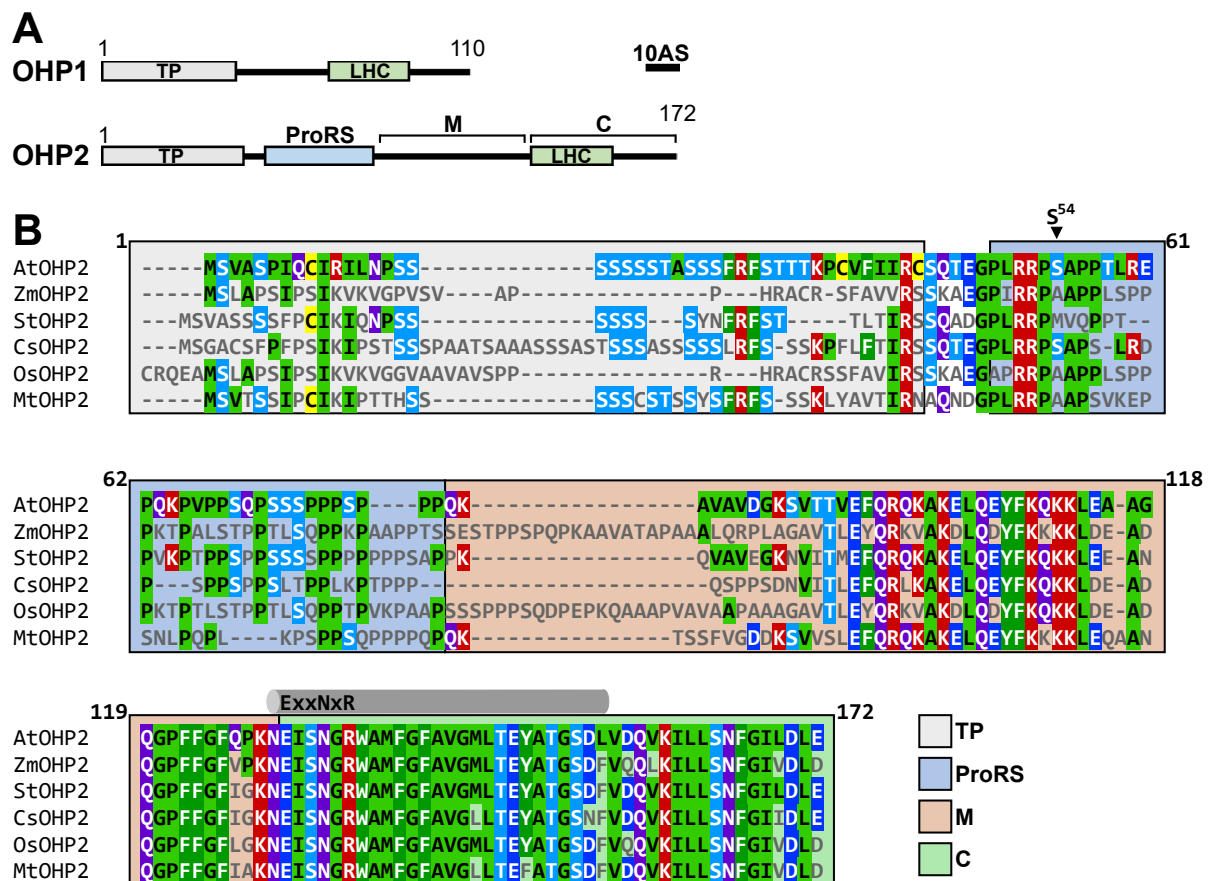


Abbildung 1.5: Aufbau der OHPs und Sequenzanalyse von OHP2. A, Domänenstruktur der beiden AtOHPs. Der Maßbalken entspricht 10 Aminosäuren (AS). TP, Transitpeptid; LHC, Transmembranhelix mit Chlorophyllbindemotiv; ProRS, Prolin-reicher Abschnitt im OHP2-Protein; M/C, M- bzw. C-Teile des OHP2-Proteins. B, Sequenzanalyse von OHP2-Proteinen. Farblich hinterlegt sind das putative Transitpeptid (TP), der Prolin-reiche Abschnitt (ProRS), der mittlere Bereich des Proteins (M), sowie der C-Terminus (C); die Aminosäuren sind entsprechend ihrer Eigenschaften farbcodiert. Die Transmembranhelix mit den konservierten Aminosäuren im Chlorophyllbindemotiv sowie das phosphorylierbare Serin 54 sind markiert. Die Zahlen beziehen sich auf das AtOHP2-Protein. Das Alignment wurde mit Clustal Omega erstellt (SIEVERS *et al.* 2011), die Sequenzen sind wie folgt bei Uniprot annotiert: AtOHP2, Q9FEC1; ZmOHP2, K7V6W2; StOHP2, M1CCH8; CsOHP2, A0A0A0KBA0; OsOHP2, Q0JLL8; MtOHP2, I3SQ77.

OHP1 mit HCF244, und postulierten ferner aufgrund von massenspektrometrischen Analysen einen Proteinkomplex aus OHP1, OHP2, HCF244, HCF173 und HCF136, welcher eine Rolle in der PSII-Synthese sowie im PSII-Reparaturzyklus spielen könnte.

1.3.3 Cyanobakterielle Hlips

In *Synechocystis* PCC6803 existieren als einzige Vertreter der LHC-Familie insgesamt fünf Hlips/SCPs (HliA-D, sowie der C-Terminus der FeCh). Von diesen sind die sich nur an neun Aminosäurepositionen unterscheidenden HliA/B-Proteine aufgrund ihres längeren N-Terminus' die größten Vertreter, während das kürzeste HliC-Protein fast nur die LHC-Helix, und das HliD-Protein die LHC-Helix mit einem gegenüber HliC etwas längeren und sequentiell abweichenden N-Terminus umfasst (Abb. 1.6). HliC und HliD unterscheiden sich untereinander und von HliA/B deutlich, die konservierten Aminosäuren im Chl-Bindemotiv (ExxNxR) sind aber in allen vier Proteinen sowie im C-Terminus der FeCh vorhanden (Abb. 1.6). Alle *Hlip*-Gene reagieren positiv auf Starklicht, wobei *HliA* und *HliB* eine schnelle und starke Induktion aufweisen, die Transkripte nach wenigen



Abbildung 1.6: Sequenzanalyse der Hlips HliA-D aus *Synechocystis* PCC 6803. Die Zahlen beziehen sich auf HliA. Das Alignment wurde mit Clustal Omega erstellt, die Sequenzen sind wie folgt annotiert: HliA, ssl2542; HliB, ssr2595; HliC, ssl1633; HliD, ssr1789.

Stunden Starklicht aber wieder destabilisiert werden (He *et al.* 2001). *HliC* reagiert im Gegensatz zu *HliD* ebenfalls schnell auf Starklicht, die Transkripte beider Gene bleiben aber auch beim Transfer vom Stark- ins Schwachlicht stabil (He *et al.* 2001).

Während der C-Terminus der cyanobakteriellen FeCh für die Dimerisierung des Proteins, jedoch nicht für die katalytische Aktivität von Bedeutung ist und vermutlich eine regulatorische Funktion besitzt (SOBOTKA *et al.* 2011), existieren für die Hlips (auch im Gegensatz zu den OHPs) vielfältige Funktionszuweisungen. Eine Assoziation der Hlips sowohl zu PSI (WANG *et al.* 2008) als auch zu PSII (PROMNARES *et al.* 2006; YAO *et al.* 2007) wurde berichtet, wobei die Spezifität der PSI-Assoziation von KOMENDA *et al.* (2016) in Frage gestellt wurde. Die Hlips können gleichermaßen in Abwesenheit von PSI akkumulieren, was eine Bindung an PSI, zumindest aber eine Stabilisierung durch PSI-Bindung unwahrscheinlich macht (FUNK *et al.* 1999). Von einem wichtigen Beitrag der Hlips zur PSII-Synthese wird ausgegangen.

1.3.3.1 Hlips in der PSII-Synthese

Durch eine Vielzahl an Interaktionsstudien und Mutantenanalysen konnte eine extensive Beteiligung der Hlips an der PSII-Synthese beschrieben werden. Die PSII-Synthese in Cyanobakterien ist durch die sequentielle Assemblierung von vier Assemblierungsmodulen (m) gekennzeichnet, die jeweils um eine der Kernuntereinheiten aufgebaut sind und in der Reihenfolge D1m-D2m-CP47m-CP43m zusammengefügt werden (KOMENDA *et al.* 2012b; KOMENDA *et al.* 2016) (vgl. Abschnitt 1.1.2.2). Ein HliC/HliD-Dimer interagiert bereits mit dem D1m-Komplex sowie mit dem zum sogenannten RCII zusammengefügt D1m-D2m-Komplex (KNOPPOVÁ *et al.* 2014). Das HliC/D-Dimer bindet den Faktor Ycf39 (vermutlich über HliD) sowie Chl a und β -Car. Der HliC/D-Ycf39-Komplex schützt D1m und RCII durch photoprotektive Energiedissipation (STALEVA *et al.* 2015). Außerdem ist ChlG über die Interaktion zu HliC/D Teil des HliC/D-Ycf39-Komplexes (CHIDGEY *et al.* 2014), was eine Chl-Transferfunktion von ChlG an D1 über das Hlip-Dimer vermuten lässt (KNOPPOVÁ *et al.* 2014). Die Autoren postulierten die parallele Existenz eines HliC/D-ChlG-Komplexes mit anderem Pigmentgehalt im Vergleich zum HliC/D-Ycf39-Komplex. Die photoprotektive Funktion des Hlip-Dimers erstreckt sich ebenfalls auf ChlG (NIEDZWIEDZKI *et al.* 2016). Das CP47m-Modul, welches anschließend zum RCII-Komplex hinzugefügt wird, wird durch ein HliA/B-Dimer geschützt, und dieses bindet auch weiterhin an den sich bildenden RCII-CP47m-Komplex (BOEHM *et al.* 2012). Der HliC/D-Ycf39-ChlG-Komplex wird abgelöst und ist nicht mehr Teil von RCII-CP47m (KOMENDA *et al.* 2016). CP43m wird im Gegensatz dazu vermutlich über die Interaktion zum PSI und dadurch ausgeübtes Quenching vor überschüssiger Anregungsenergie geschützt (KOMENDA *et al.* 2012a).

1.3.3.2 Hlips und die Chlorophyllbiosynthese

Frühzeitiger als bei den im letzten Absatz erwähnten Arbeiten ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Hlips an der Regulation der TP-BS in Cyanobakterien aus der Analyse von PSI-defizienten *Synechocystis*-Stämmen: Die zusätzliche Deletion der DPOR-Untereinheit ChlL (*chlL*⁻) sowie von HliD im PSI-defizienten Hintergrund führte zu einer verringerten Pchlid-Akkumulation in der Dunkelheit (XU *et al.* 2002). Die Autoren postulierten eine Chl-Sensor-Funktion für HliC und HliD, welche gemäß des Modells in ihrem Chl-freien Zustand eine stimulierende Funktion auf frühe Schritte der TP-BS ausüben sollen (XU *et al.* 2002; XU *et al.* 2004). Dies wurde gestützt durch die Beobachtung, dass PSI-defiziente/*chlL*⁻-Stämme mit einer zusätzlichen Deletion von HliC oder HliD eine verringerte Chl-Syntheserate beim Transfer von der Dunkelheit ins Licht aufwiesen (XU *et al.* 2004). Zudem zeigte ein PSI-defizienter/*chlL*⁻/Hlip⁻-Stamm (Deletion aller fünf Hlips) eine sehr langsame Chl-Biosyntheserate und setzte bevorzugt exogen appliziertes (¹⁵N-markiertes) ALA zu Chl um (YAO *et al.* 2012). Die Autoren schränkten in ihrer Schlussfolgerung allerdings selbst ein, dass die Verbindung zwischen den Hlips und der TP-BS indirekt sein könnte. Neben diesem möglichen Einfluss der Hlips auf die frühen Schritte der Chl-Biosynthese kann eine Interaktion zur cyanobakteriellen ChlG als bestätigt gelten. Diese Interaktion ist jedoch nicht regulativer, sondern protektiver Natur (s.o.).

1.3.4 Chlorophyllbindung durch die Proteine der LHC-Familie

Während für die ELIPs, SEP3 und die Hlips lediglich eine grundsätzliche Befähigung zur Bindung von Pigmenten nachgewiesen werden konnte, existieren von den LHCPs bereits hochaufgelöste Kristallstrukturen, die Aufschluss über die Pigmentbindestellen und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren geben.

1.3.4.1 Pigmentbindung an LHCII

LHCII-Trimere (LHCB1-3) binden 8 Chl a-, 6 Chl b-, 2 Lutein-, 1 Neoxanthin- und 1 Viola-/Zeaxanthin-Molekül(e) pro Monomer (LIU *et al.* 2004), und LHCB4-6 unterscheiden sich in der Anzahl der gebundenen Pigmente nur geringfügig (LHCB4: 13 Chl, 3 Carotinoide (PAN *et al.* 2011); LHCB5: 9 Chl, 2,5 Carotinoide (AHN *et al.* 2008); LHCB6: 10 Chl, 2 Carotinoide (AHN *et al.* 2008)). Ähnliche Werte (10-12 Chl, 2-3 Carotinoide) gelten auch für die LHCA (CROCE *et al.* 2002). Bei der Chl-Bindung in LHCII werden die zentralen Mg-Atome der 14 Chl-Moleküle 7x von Aminosäureseitengruppen, 2x von Carbonylgruppen des Peptidrückgrats, 4x von H₂O-Molekülen und 1x von einem Lipid komplexiert (LIU *et al.* 2004).

Von zentraler Bedeutung für die Chl-Bindung sind die X-förmig angeordneten Helices 1 und 3 (KÜHLBRANDT *et al.* 1994), die alleine mindestens 5 Chl-Moleküle über Kontakt zu Aminosäureseitengruppen komplexieren, wobei ein kurzer Abschnitt konservierter Aminosäuren am Anfang des Chl-Bindemotivs beider Helices direkten Kontakt zu 4 dieser Chl-Moleküle hat (Abb. 1.7 A,B).

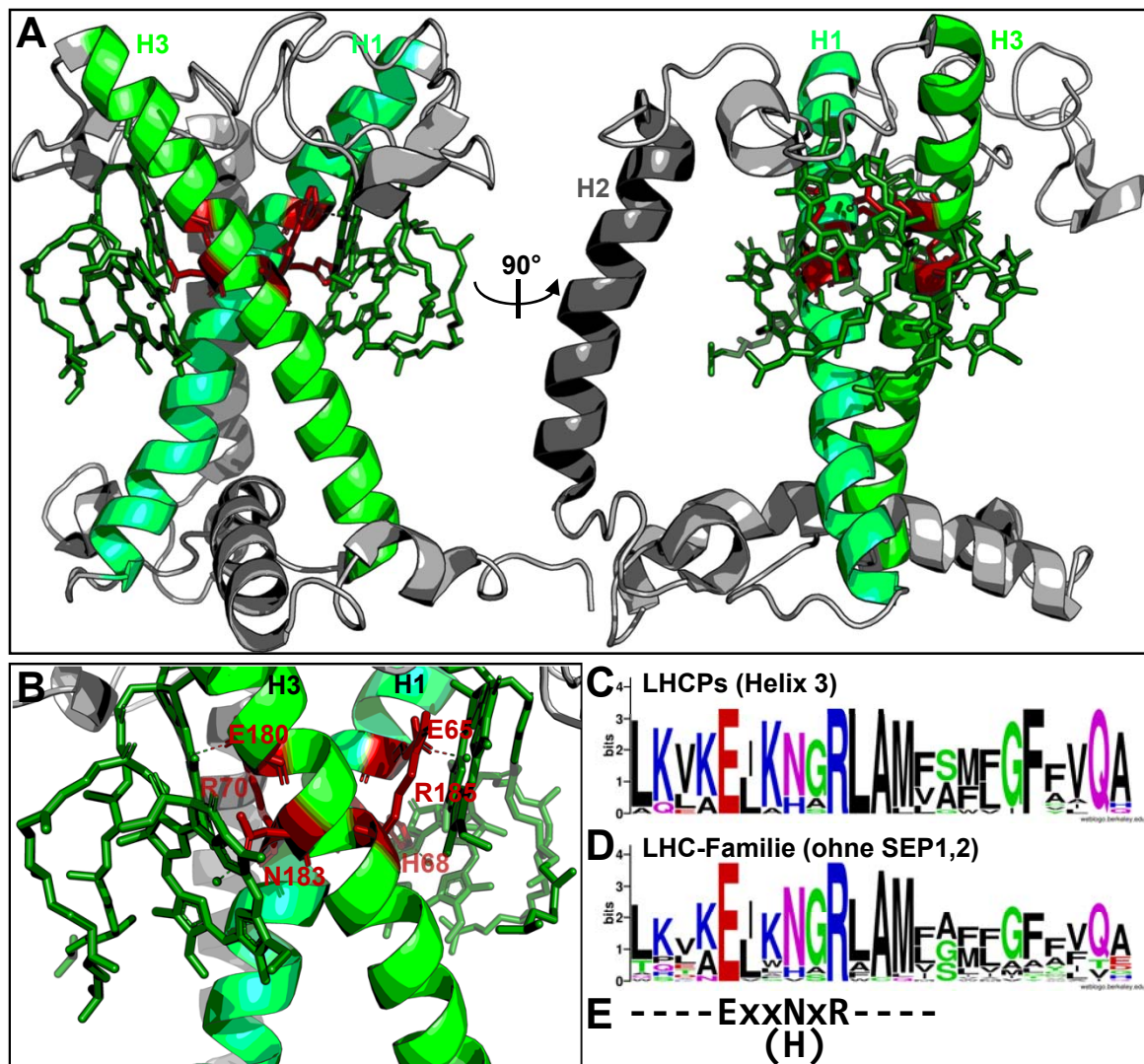


Abbildung 1.7: Chlorophyllbindung durch LHCII. A, Darstellung der Kristallstruktur eines LHCII-Monomers (Teil eines LHCII-Trimers) aus *Spinacia oleracea* (Liu *et al.* 2004, PDB-Eintrag 1rwt). Die drei Transmembranhelices sind farblich markiert (H1, H3 grün; H2 dunkelgrau) und ausschließlich die vier von den konservierten Aminosäuren (rot markiert, siehe Text) gebundenen Chl a-Moleküle sind gezeigt. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (SCHRÖDINGER 2015). B, Detailansicht der Chl-Bindung durch die konservierten Aminosäuren. Die rot markierten Aminosäuren sind entsprechend ihrer Position in der Sequenz bezeichnet. Die gestrichelten Linien zeigen die Interaktionen der Aminosäureseitenketten mit den zentralen Mg-Atomen der Chl a-Moleküle. C/D, Sequenzanalyse des Chl-Bindemotivs der LHC-Familie aus *Arabidopsis*. Ein Alignment der Sequenzen wurde mittels der Software WebLogo (CROOKS *et al.* 2004) auf Aminosäureidentität an den einzelnen Positionen untersucht. Dazu wurde einerseits Helix 3 der LHCPs (C) bzw. Helix 3 (Helix 1 der OHPs und LIL3s) aller Proteine außer SEP1,2 herangezogen (D). E, Die im Text referenzierte Umgebung um die beiden vollständig konservierten Aminosäuren ExxxxR.

Dieser Abschnitt mit der Sequenz ExxN/HxR findet sich wie oben beschrieben fast in allen Proteinen der LHC-Familie, und zu den Aminosäuren E und R gibt es (mit Ausnahme von SEP1) keine Alternativen an den entsprechenden Positionen (Abb. 1.7 C-E). Während sich in den LHCPs an Position 4 des genannten Abschnitts ein N oder H befindet, enthalten die anderen Proteine dort entweder ein konserviertes N (ELIPs, SEP3 und OHPs), ein konserviertes V (PsbS) oder die Position ist nicht stark konserviert (SEP1,2).

Die vier in LHCII von diesem Sequenzbereich gebundenen Chl a-Moleküle werden jeweils von E und N/H am Mg-Atom komplexiert, die R-Seitengruppen nehmen zusätzlich noch Kontakt zu

anderen Chl-Molekülen auf (Liu *et al.* 2004). Im Gegensatz zu den Chl-Molekülen hat keines der von LHCII gebundenen Carotinoide direkten Kontakt zum Bindemotiv der Helices 1 oder 3. Von Bedeutung ist weiterhin, dass die Chl a/b-Bindestellen nicht variabel sind, was vor allem durch die chemische Umgebung von LHCII in der Nähe von Position 7 des Tetrapyrrolrings (Methylgruppe bei Chl a, Formylgruppe bei Chl b) verursacht wird (Liu *et al.* 2004).

1.3.4.2 Pigmentbindung an Hlips

Neben des Kristallstruktur-Nachweises der Chl-Bindung der LHCPs liegen für die ELIPs und LIL3s wenigstens *in vitro*-Daten vor, die eine Pigmentbindung vermuten lassen (s.o.), auch wenn die exakte Natur (Anzahl und Lokalisation der Bindestellen) dieser Bindung unklar ist. Die Aufreinigung von cyanobakteriellen Hlips dagegen, entweder direkt oder als Teil von größeren Komplexen über getaggte Bindungspartner, ermöglichte Schlussfolgerungen über die Zahl und Identität der gebundenen Pigmente: Über His-getaggttes Ycf39 konnte ein gebundenes HliD-Dimer (bzw. HliC/D-Dimer) co-präzipitiert werden, welches Chl a und β -Car enthielt (KNOPOVÁ *et al.* 2014). Nähere Analysen zeigten ein 3:1-Verhältnis von Chl a zu β -Car, genauer wurden 6 Chl a und 2 β -Car-Moleküle pro Dimer nachgewiesen (STALEVA *et al.* 2015). Davon war eines der β -Car-Moleküle entlang seiner Längsachse verdreht und lag dadurch in einer permanenten Energie-dissipierenden Konformation vor (STALEVA *et al.* 2015; LLANSOLA-PORTOLES *et al.* 2017). Die Aufreinigung eines HliC/D-Dimers über His-getaggttes ChlG dagegen ergab einen Komplex, der Chl a und neben β -Car auch Zeaxanthin und Myxoxanthophyll enthielt (CHIDGEY *et al.* 2014; NIEDZWIEDZKI *et al.* 2016) (Chl a zu Carotinoiden dabei im ungewöhnlichen Verhältnis 1:1), wobei Zeaxanthin und Myxoxanthophyll vermutlich an der Kontaktstelle zwischen ChlG und den Hlips lokalisiert sind (NIEDZWIEDZKI *et al.* 2016). Auch in diesem Komplex fungiert ein β -Car-Molekül als Energie-Quencher (NIEDZWIEDZKI *et al.* 2016).

Neben der mehrfach bestätigten Chl-Bindeeigenschaft von HliD bzw. des HliC/D-Dimers konnte auch für ein HliC eine Pigmentbindung nachgewiesen werden: Die Aufreinigung von HliC aus einem HliD-defizienten Stamm ergab das Vorliegen eines HliC-Homo-Dimers (bzw. von HliC-Homo-Oligomeren) mit einem 2:1-Verhältnis an gebundenen Chl a zu β -Car-Molekülen (SHUKLA *et al.* 2018). Ein HliC-Dimer enthielt vermutlich 4 Chl a- und 2 β -Car-Moleküle.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Pigmentbindung immer mindestens ein LHC-Helix-Paar (in Form eines Hlip- oder LIL3-Dimers, bzw. intramolekular durch Assoziation von Helix 1 und 3 bei den LHCPs und ELIPs) voraussetzt.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Eine normale Pflanzenentwicklung setzt das Vorhandensein bestimmter Proteine der LHC-Familie zwingend voraus: Insbesondere ein Verlust beider LIL3-Isoformen (*lil3.1/lil3.2*) sowie von OHP1 (*ohp1*) bzw. OHP1 und OHP2 zusammen (*ohp2*) führt zu drastischen Entwicklungsstörungen, die vermutlich auf eine beeinträchtigte Chloroplastenentwicklung bzw. eine gestörte Assemblierung der Photosysteme zurückgeführt werden können. Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse und eingehende Charakterisierung der physiologischen Konsequenzen eines Verlustes von LIL3 bzw. der OHPs, sowie eine Funktionsbeschreibung dieser beiden Vertreter der LHC-Familie in Bezug auf ihre Relation zur Chlorophyllbiosynthese sowie zur Biogenese der Komplexe der Thylakoidmembran. Im Einzelnen waren folgende Punkte von besonderem Interesse:

- Aufgrund der mindestens teilweise funktionellen Redundanz von LIL3.1 und LIL3.2 sollten die Konsequenzen eines gleichzeitigen Verlustes beider Proteine näher charakterisiert werden. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf den Einfluss von LIL3 auf die Enzyme der TP-BS gelegt.
- In Anbetracht des zu Beginn dieser Arbeit geringen Kenntnisstands bezüglich der physiologischen und biochemischen Konsequenzen eines Verlusts von OHP1 und OHP2 sollten diese zunächst umfassend charakterisiert werden. Hierbei wurden sowohl Effekte in Bezug auf die TP-BS, als auch auf die Thylakoidmembranbiogenese bzw. Assemblierung der Photosysteme untersucht.
- Nachdem anfängliche Experimente die Bildung eines OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes nahelegten, galt der funktionellen Charakterisierung der Einzelkomponenten dieses Komplexes besonderes Augenmerk. Sowohl die detaillierte Funktionsbeschreibung der Proteine und ihr Zusammenspiel in der PSII-Biogenese, als auch eine kleinteiligere funktionelle Untersuchung einzelner Peptidabschnitte bzw. Aminosäuren der einzelnen Proteine waren Gegenstand der Untersuchung.
- Während das Wissen zur Chl-Bindung der LHCPs bereits sehr umfänglich war, waren in Bezug auf LIL3 nur Daten hinsichtlich einer generellen Befähigung zur Chl-Bindung, und für OHP1/2 schließlich überhaupt keine Hinweise verfügbar. Aufgrund der Verbindung von LIL3 zur TP-BS war die Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Intermediaten der TP-BS von Interesse. In Bezug auf OHP1/2 dagegen sollte die generelle Bindung von Pigmenten bzw. der Einfluss der konservierten Aminosäuren im Chl-Bindemotiv auf die Funktion von OHP1/2 untersucht werden.

2 Publikationen

Im Zeitraum dieser Promotionsarbeit wurden folgende Publikationen veröffentlicht:

1. Hey, D., P. Ortega-Rodes, T. Fan, F. Schnurrer, L. Brings, B. Hedtke & B. Grimm (2016). "Transgenic Tobacco Lines Expressing Sense or Antisense FERROCHELATASE 1 RNA Show Modified Ferrochelatase Activity in Roots and Provide Experimental Evidence for Dual Localization of Ferrochelatase 1". In: Plant & Cell Physiology 57.12, S. 2576–2585. Doi: 10.1093/pcp/pcw171.
2. Hey, D., M. Rothbart, J. Herbst, P. Wang, J. Müller, D. Wittmann, K. Gruhl & B. Grimm (2017). "LIL3, a Light-Harvesting Complex Protein, Links Terpenoid and Tetrapyrrole Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*". In: Plant Physiology 174.2, S. 1037–1050. Doi: 10.1104/pp.17.00505.
3. Hey, D. & B. Grimm (2018a). "ONE-HELIX PROTEIN 2 (OHP2) is required for the stability of OHP1 and assembly factor HCF244 and is functionally linked to PSII biogenesis". In: Plant Physiology 177.4, S. 1453–1472. Doi: 10.1104/pp.18.00540.
4. Hey, D. & B. Grimm (2018b). "Requirement of ONE-HELIX PROTEIN 1 (OHP1) in early *Arabidopsis* seedling development and under high light intensity". In: Plant Signaling & Behavior, Artikel: e1550317. Doi: 10.1080/15592324.2018.1550317.

Von diesen sind die Publikationen mit den Nummern 2-4 Teil dieser kumulativen Dissertation. Im Folgenden werden die Publikationen einzeln aufgeführt, sowie der jeweilige Beitrag des Erstautors kenntlich gemacht.

2.1 Publikation I: LIL3, a Light-Harvesting Complex Protein, Links Terpenoid and Tetrapyrrole Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*

Beitrag

An dieser Publikation war ich in folgendem Umfang beteiligt:

- Sämtliche Experimente zu den Abbildungen 3, 4 und 7 (d.h. die Experimente betreffend die VIGS-LIL3.1/3.2-Linien) wurden von mir durchgeführt. Weiterhin habe ich ergänzende Daten zu den in den Abb. 2 gezeigten Experimenten beigetragen. Im Einzelnen waren dies: Abb. 2A komplett, sowie ergänzende Western Blots zu Abb. 2B.
- Die Daten zu den in Abb. 8 gezeigten Experimenten wurden von Jakob Müller im Rahmen seines Projektmodules in der AG Grimm unter meiner Betreuung gesammelt.
- Zusätzlich zu der Durchführung und Auswertung der o.g. Experimente habe ich die Zusammenstellung sämtlicher im Manuskript enthaltenen Abbildungen aus den Rohdaten übernommen. Dies schließt die Erstellung der Abbildungen 1 und 9 mit ein.

Abstract

The LIL3 protein of *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) belongs to the light-harvesting complex (LHC) protein family, which also includes the light-harvesting chlorophyll-binding proteins of photosystems I and II, the early-light-inducible proteins, PsbS involved in nonphotochemical quenching, and the one-helix proteins and their cyanobacterial homologs designated high-light-inducible proteins. Each member of this family is characterized by one or two LHC transmembrane domains (referred to as the LHC motif) to which potential functions such as chlorophyll binding, protein interaction, and integration of interacting partners into the plastid membranes have been attributed. Initially, LIL3 was shown to interact with geranylgeranyl reductase (CHLP), an enzyme of terpene biosynthesis that supplies the hydrocarbon chain for chlorophyll and tocopherol. Here, we show another function of LIL3 for the stability of protochlorophyllide oxidoreductase (POR). Multiple protein-protein interaction analyses suggest the direct physical interaction of LIL3 with POR but not with chlorophyll synthase. Consistently, LIL3-deficient plants exhibit substantial loss of POR as well as CHLP, which is not due to defective transcription of the POR and CHLP genes but to the posttranslational modification of their protein products. Interestingly, in vitro biochemical analyses provide novel evidence that LIL3 shows high binding affinity to protochlorophyllide, the substrate of POR. Taken together, this study suggests a critical role for LIL3 in the organization of later steps in chlorophyll biosynthesis. We suggest that LIL3 associates with POR and CHLP and thus contributes to the supply of the two metabolites, chlorophyllide and phytyl pyrophosphate, required for the final step in chlorophyll a synthesis.

2.2 Publikation II: ONE-HELIX PROTEIN 2 (OHP2) is required for the stability of OHP1 and assembly factor HCF244 and is functionally linked to PSII biogenesis

Beitrag

An dieser Publikation war ich in folgendem Umfang beteiligt:

- Sämtliche Experimente wurden von mir durchgeführt und ausgewertet, sowie die Abbildungen erstellt.
- Weiterhin habe ich die Erstfassung des Manuskripts geschrieben und war auch an der weiteren Aus- und Umarbeitung des Manuskripts beteiligt.

Abstract

The members of the light-harvesting-complex protein (LHCP) family, which include the one-helix proteins (OHPs), are characterized by one to four membrane-spanning helices. These proteins function in light absorption and energy dissipation, sensing light intensity, and triggering photomorphogenesis or binding of chlorophyll and intermediates of chlorophyll biosynthesis. *Arabidopsis thaliana* contains two OHPs, while four homologs (named high-light-induced proteins, Hlips) exist in *Synechocystis* PCC6803. Various functions have been assigned to Hlips, ranging from photoprotection and assembly of photosystem (PS) I and PSII to regulation of the early steps of chlorophyll biosynthesis, but little is known about the function of the two plant OHPs. Here, we show that the two *Arabidopsis* OHPs form heterodimers and that the stromal part of OHP2 interacts with the plastid-localized PSII assembly factor HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE 244 (HCF244). Moreover, concurrent accumulation of the two OHPs and HCF244 is critical for the stability of all three proteins. In particular, the absence of OHP2 leads to the complete loss of OHP1 and HCF244. We used a virus-induced gene silencing approach to minimize the expression of OHP1 or OHP2 in adult *Arabidopsis* plants and revealed that OHP2 is essential for the accumulation of the PSII core subunits, while the other photosynthetic complexes and the major LHCPs remained unaffected. We examined the potential functions of the OHP1-OHP2-HCF244 complex in the assembly and/or repair of PSII and propose a role for this heterotrimeric complex in thylakoid membrane biogenesis.

2.3 Publikation III: Requirement of ONE-HELIX PROTEIN 1 (OHP1) in early *Arabidopsis* seedling development and under high light intensity

Beitrag

An dieser Publikation war ich in folgendem Umfang beteiligt:

- Sämtliche Experimente wurden von mir durchgeführt und ausgewertet, sowie die Abbildungen erstellt.
- Weiterhin habe ich die Erstfassung des Manuskripts geschrieben und war auch an der weiteren Aus- und Umarbeitung des Manuskripts beteiligt.

Abstract

Plant ONE-HELIX PROTEINS (OHPs) are part of the light-harvesting complex superfamily whose members are involved in various processes related to sensing and capturing light as well as light protection. We recently showed the requirement of a functional OHP1-OHP2 heterodimer for efficient D1 synthesis. Interestingly, while the *ohp1* knockout mutant showed a strong defect in accumulation of the photosystem II and is hardly viable, virus-induced gene silencing of *OHP1* had no detectable impact on plant growth and performance under standard growth conditions. However, *in vivo* labeling assays with ^{35}S -methionine indicate a reduced D1 synthesis rate. Here, we show that VIGS-OHP1 plants are more susceptible towards elevated light intensities than control plants. This underlines an obligatory function of OHP1 for light acclimation.

3 Weiterführende Ergebnisse

3.1 Posttranslationale Regulation der OHPs

3.1.1 Redoxkontrolle von OHP1

Während der Aufreinigung rekombinant exprimierter OHP1-Proteine fiel auf, dass meist nicht nur eine Proteinbande bei dem erwarteten Molekulargewicht auftrat, sondern zusätzlich eine Bande bei in etwa dem Doppelten des Molekulargewichts zu sehen war. Es wurde vermutet, dass es zur redoxabhängigen Dimerisierung zweier OHP1-Moleküle kam. OHP1 verfügt über ein einziges Cystein im reifen Protein an Position 76, d.h. im Bereich der TMH. Dieses Cystein ist zudem innerhalb der OHP1-Proteine verschiedener Pflanzenspezies konserviert (Abb. 3.1 A). Die Bildung inter- bzw. intramolekularer Disulfidbrücken gehört zu den posttranslationalen Regulationsmechanismen (vgl. Abschnitt 3.1.1). Somit war es das Ziel, die mögliche Redoxregulation von OHP1 zu untersuchen.

3.1.1.1 *In vitro*-Redoxassay

Zur Untersuchung der Hypothese der Redoxkontrolle von OHP1 wurde rekombinantes OHP1-Protein mit unterschiedlichen reduzierenden (DTT) und oxidierenden Reagenzien (H_2O_2 bzw. CuCl_2) inkubiert. Um die Bedeutung des Cysteins an Position 76 für die redoxabhängige Dimerisierung zu überprüfen, wurde neben dem Wildtyp-Protein auch eine OHP1-Variante eingesetzt, bei welcher das Cystein durch ein Alanin ersetzt wurde (C76A). Während das unbehandelte Protein als Monomer und Dimer auftrat, konnten die Dimere durch Zugabe von DTT aufgelöst werden. Im Gegensatz dazu verschoben die oxidierenden Reagenzien das Gleichgewicht vollständig in Richtung des Dimers (Abb. 3.1 B). Die OHP1-C76A-Variante lag dagegen in allen Ansätzen ausschließlich als Monomer vor.

3.1.1.2 Redoxassay mit Thylakoiden

Um zu überprüfen, ob OHP1-Dimere auch in Pflanzenmaterial nachweisbar waren, bzw. ob das membrangebundene OHP1 zwischen den beiden Redoxzuständen umgeschaltet werden konnte, wurden Thylakoide aus VIGS-GFP und VIGS-OHP1-Pflanzen extrahiert und ebenfalls mit reduzierenden (DTT) und oxidierenden Reagenzien (Diamid bzw. H_2O_2) inkubiert. Da der Nachweis der Proteine hier durch Western Blot erfolgte, wurde VIGS-OHP1 als Negativkontrolle einbezogen. Zusätzlich zu der OHP1-Bande bei etwas unter 10 kDa waren sowohl in VIGS-GFP als auch in VIGS-OHP1 unspezifische Banden bei 100 kDa und etwa 50 kDa sichtbar (Abb. 3.1 C). In der unbehandelten Probe trat OHP1 ausschließlich als Monomer auf. Die Inkubation in Gegenwart von Diamid führte zu drei zusätzlichen Banden bei etwa 80, 40 und 15 kDa, während die Zugabe von H_2O_2 ohne Auswirkung blieb. Da die 40 kDa-Bande ebenfalls bei VIGS-OHP1 sichtbar war, ist sie als unspezifische Kreuzreaktion des α -OHP1-Antikörpers anzusehen. Demgegenüber wurden die

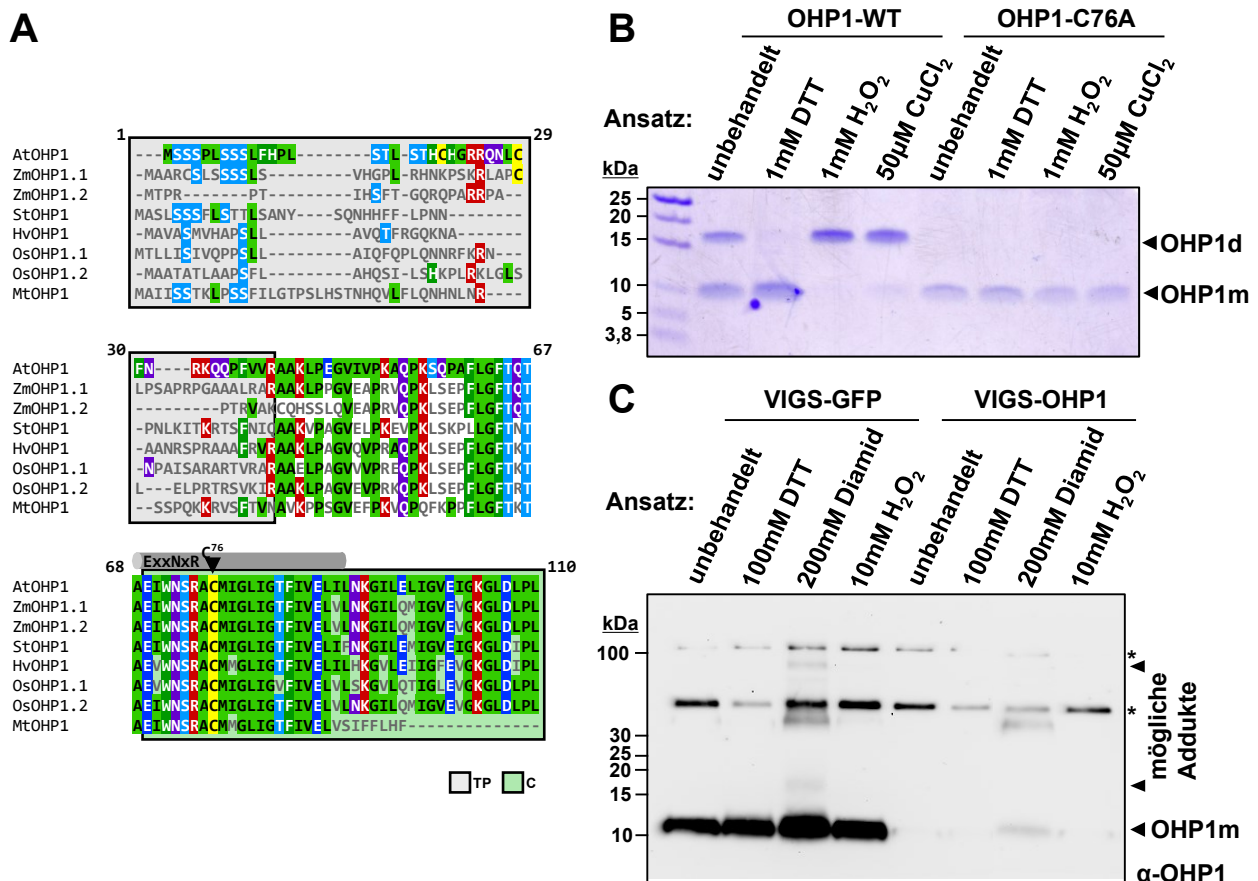


Abbildung 3.1: *In vitro*-Redoxversuche mit OHP1 und Sequenzanalyse von OHP1-Proteinen. A, Sequenzanalyse von OHP1-Proteinen. Farblich hinterlegt sind das putative Transitpeptid (TP) sowie der C-Terminus (C); die Aminosäuren sind entsprechend ihrer Eigenschaften farbcodiert. Die Transmembranhelix mit den konservierten Aminosäuren im Chl-Bindemotiv sowie das konservierte Cystein sind markiert, die Zahlen beziehen sich auf das AtOHP1-Protein. Das Alignment wurde mit Clustal Omega erstellt, die Sequenzen sind wie folgt bei Uniprot annotiert: AtOHP1, O81208; ZmOHP1.1, B6T9F9; ZmOHP1.2, K7V916; StOHP1, M1AHJ7; HvOHP1, F2DNT2; OsOHP1.1, Q2QQX1; OsOHP1.2, Q0DJF5; MtOHP1, A0A072TZM6. B, Redoxassay mit rekombinanten OHP1-Proteinen. Gleiche Mengen an OHP1-WT und OHP1-C76A-Protein wurden in einer Lösung der Konzentration 0,2µg/µl mit den angegebenen Reagenzien versetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit nichtreduzierendem Ladepuffer versetzt, elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. OHP1m bezeichnet das Monomer und OHP1d das Dimer. C, Redoxassay mit Thylakoidmembranen aus VIGS-GFP und VIGS-OHP1-Pflanzen. Thylakoidmembranen wurden in einer Lösung der Konzentration 0,25µg/µl (Chl) mit den angegebenen Reagenzien versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen pelletiert, mit nichtreduzierendem Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Western Blotting wurde die Membran mit dem OHP1-Antikörper inkubiert. Asteriske bezeichnen unspezifische Signale.

80 und 15 kDa-Banden nur in VIGS-GFP detektiert, repräsentieren also potentielle OHP1-Addukte. Die Bande um 15 kDa entspricht in etwa der erwarteten Größe eines OHP1-Dimers, diejenige bei 80 kDa könnte ein Reaktionsprodukt von OHP1 mit einem anderen interagierenden Protein darstellen. Insgesamt ist die Menge der gebildeten Addukte im Vergleich zum OHP1-Gesamtgehalt allerdings sehr gering. Zudem sind die Addukte nicht in der unbehandelten Probe zu sehen, treten also zumindest in im Licht geernteten Blattmaterial unter Standardbedingungen nicht auf.

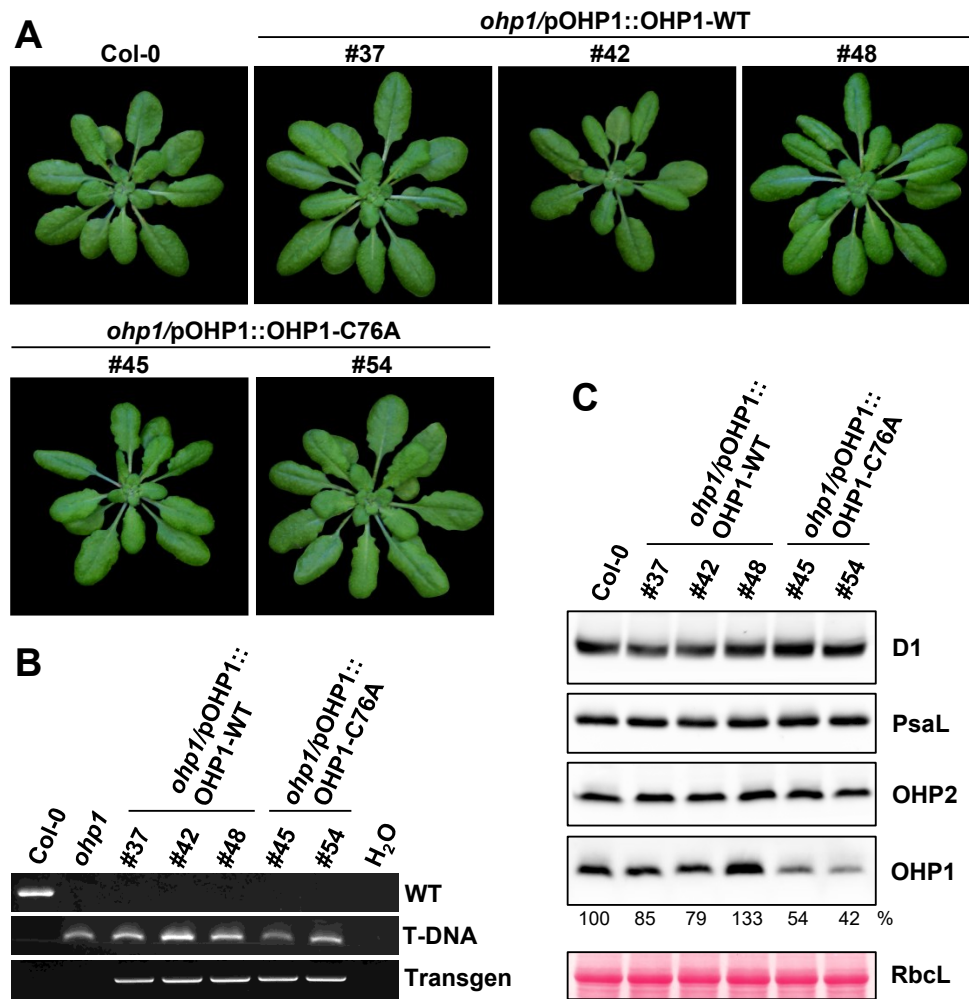


Abbildung 3.2: Komplementation von *ohp1* mit einer OHP1-C76A-Variante. A, Phänotyp vier Wochen alter Pflanzen der Komplementationslinien. Die Pflanzen wurden auf Erde unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht, $100 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$) angezogen. B, Genotypisierungs-PCR zur Bestätigung der Homozygotie der untersuchten Komplementationslinien. C, Western Blot-Analyse der Komplementationslinien. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt. Die Zahlen unterhalb des OHP1-Blots geben die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten, bezogen auf das WT-Signal, wieder.

3.1.1.3 Komplementation von *ohp1* mit einer OHP1-C76A-Variante

Um den Beitrag des redoxaktiven Cysteins 76 zur Funktion von OHP1 *in planta* zu untersuchen, wurde die *ohp1*-Mutante mit einem OHP1-C76A-Konstrukt komplementiert. In diesem wird das OHP1-Gen mit einem zu C76A-führenden Basenaustausch unter dem nativen OHP1-Promotor exprimiert. Als Kontrolle diente ein Wildtyp-Genkonstrukt (OHP1-WT), welches das WT-Gen enthielt (ca. 1000bp *upstream* des Startcodons bis 500bp nach dem Stopcodon; das OHP1-C76A-Konstrukt deckte den gleichen Teil des Gens ab.).

Sowohl die Pflanzen der OHP1-WT- als auch die der OHP1-C76A-Komplementationslinien mit homozygotem *ohp1*-Hintergrund wiesen keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp *Col-0* auf (Abb. 3.2 A). Beide Konstrukte waren in der Lage, den Verlust des endogenen OHP1-Gens zu kompensieren. Die Homozygotie hinsichtlich der OHP1-T-DNA-Insertion der untersuchten Linien wurde mittels Genotypisierungs-PCR bestätigt (Abb. 3.2 B). Eine Analyse der OHP1-Proteingehalte

ergab, dass die OHP1-WT-Komplementationslinien mit 80 bis 130% OHP1 im Vergleich zum WT in etwa WT-OHP1-Level aufwiesen (Abb. 3.2 C). Die OHP1-C76A-Linien dagegen besaßen nur etwa 50% des WT-OHP1-Gehalts. Trotzdem waren in allen Linien die Mengen an OHP2, sowie an D1 (stellvertretend für PSII) und PsaL (PSI) unverändert. Unter Standardbedingungen ist das Vorliegen des Cysteins 76 daher als nicht essentiell für die Funktion von OHP1 anzusehen. Dass eine um 50% verringerte Akkumulation von OHP1 (wie in den OHP1-C76A-Linien beobachtet) zu keiner makroskopischen phänotypischen Veränderung der Pflanzen führt, könnte auf eine Toleranzgrenze im Verlust von OHP1 hindeuten. Andererseits kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass das Cystein als Epitop für den α -OHP1-Antikörper dient, und dieser daher die OHP1-C76A-Variante schlechter erkennt als das WT-Protein.

3.1.1.4 Redoxassay mit den OHP1-WT und OHP1-C76A-Komplementationslinien

Um besser abschätzen zu können, welche Banden im *in vitro*-Redoxassay mit Thylakoiden tatsächlich von einer Disulfidbrückenbildung von OHP1 mit anderen Proteinen stammten, wurde zusätzlich ein Redoxassay mit Thylakoiden aus den OHP1-WT und OHP1-C76A-Komplementationslinien durchgeführt (Abb. 3.3 A). Ähnlich zum Redoxassay mit den VIGS-Linien (Abb. 3.1 C) traten im WT und der OHP1-WT-Linie bei Inkubation mit Diamid im Vergleich zu den mit DTT vollständig reduzierten, monomeren OHP1-Proteinen zusätzliche Banden auf: Einerseits war ausschließlich bei Behandlung mit Diamid eine (Doppel)-Bande bei etwa 15 kDa sichtbar, die von der Größe her einem OHP1-Dimer entsprechen könnte. Diese erschien wie alle anderen zusätzlichen Banden nicht in der OHP1-C76A-Linie. Das OHP1-Signal in der OHP1-C76A-Linie entsprach daher dem DTT-behandelten WT-Signal. Zusätzlich zum vermeintlichen OHP1-Dimer waren in den unbehandelten bzw. mit Diamid inkubierten WT- und OHP1-WT-Proben Signale bei etwa 30 kDa sowie eine Vielzahl hochmolekularer Banden sichtbar, die möglichen OHP1-Addukten entsprechen könnten. Dass die Bildung des vermeintlichen OHP1-Dimers nur bei Behandlung mit Diamid, nicht aber in den unbehandelten Proben auftrat, lässt dessen physiologische Relevanz generell unbedeutend erscheinen.

Schlussendlich war von Interesse, ob bzw. welche der im *in vitro*-Assay detektierbaren, höhermolekularen OHP1-Addukte sich als Reaktion auf wechselnde Lichtbedingungen verändern würden. Dazu wurden der WT und die Komplementationslinien unter Kurztagbedingungen angezogen und anschließend 18h Starklicht ($850\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$) bzw. Dunkelheit ausgesetzt (Abb. 3.3 B,C). Die elektrophoretische Auftrennung von WT-Gesamtproteinextrakten ohne DTT zeigte, dass unter allen Lichtbedingungen das 30 kDa-Addukt sowie ein höhermolekulares Addukt existierten (Abb. 3.3 B). Bei Zugabe von DTT verschwanden die entsprechenden Banden. Unter keiner der Bedingungen waren Signale der Größe eines OHP1-Dimers sichtbar.

Die Analyse von Gesamtproteinextrakten der Komplementationslinien unter den gleichen Lichtbedingungen ergab für alle Bedingungen das exakt gleiche Muster an Banden (Abb. 3.3 C): Wie beim WT lagen eine Adduktbande bei 30 kDa sowie zwei höhermolekulare Banden vor, wobei keine dieser Banden in den OHP1-C76A-Linien detektierbar war. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass diese Signale tatsächlich von OHP1 stammen.

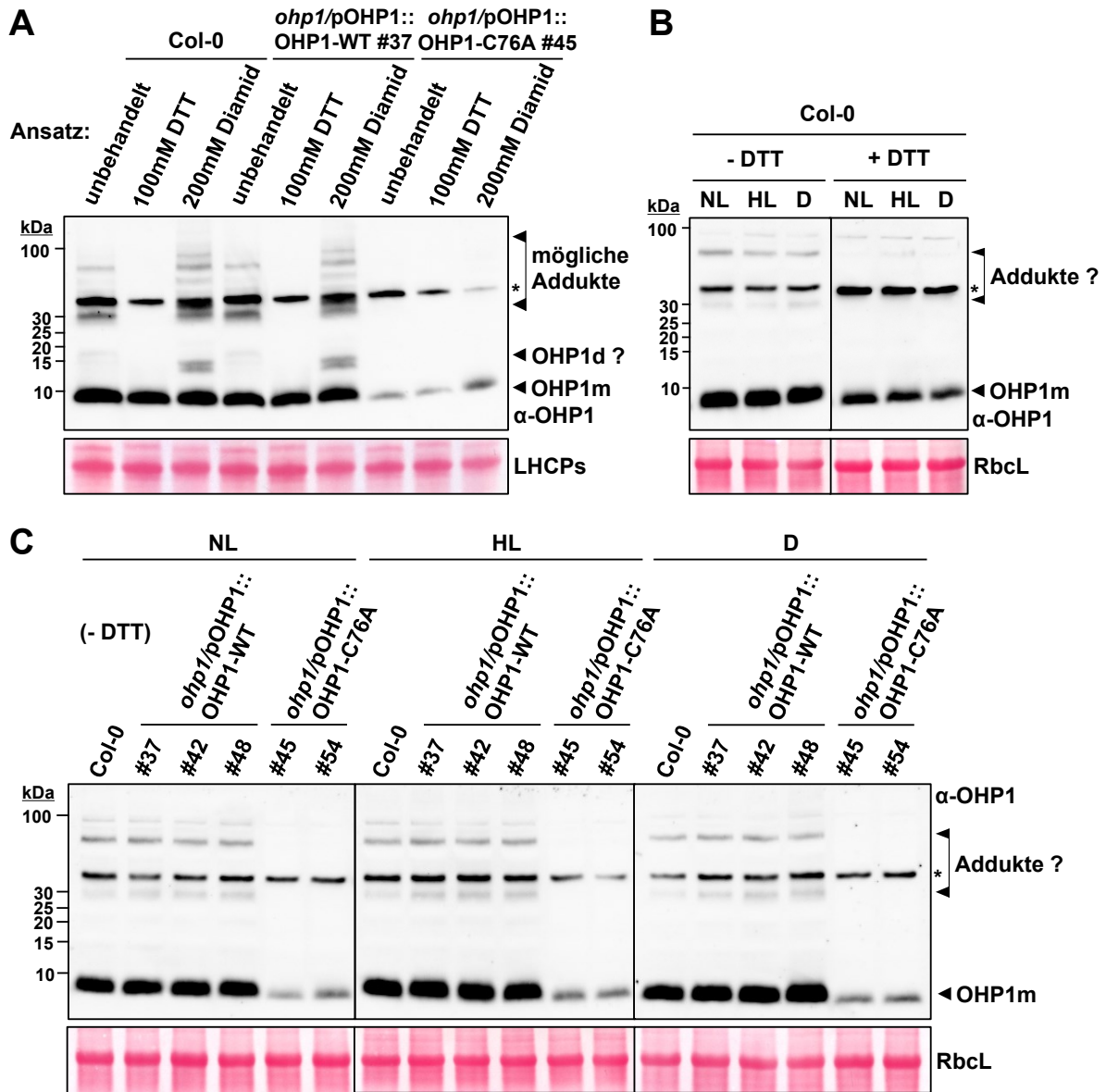


Abbildung 3.3: Redoxassay mit den OHP1-WT und OHP1-C76A-Komplementationslinien und Analyse des Redoxstatus von OHP1 in planta. **A**, *In vitro*-Redoxassay mit Thylakoidmembranen aus den Komplementationslinien. Thylakoidmembranen wurden in einer Lösung der Konzentration 0,25µg/µl (Chl) mit den angegebenen Reagenzien versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen pelletiert, mit nichtreduzierendem Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Western Blotting wurde die Membran mit dem OHP1-Antikörper inkubiert. Das OHP1-Monomer (OHP1m), das eventuelle OHP1-Dimer (OHP1d) sowie mögliche OHP1-Addukte sind gekennzeichnet. Als Ladekontrolle ist die den LHCPs entsprechende Bande gezeigt. **B**, Analyse des Redoxstatus' von OHP1 im WT bei unterschiedlichen Lichtbedingungen. Die Pflanzen wurden drei Wochen unter Kurztagbedingungen (100µmol Photonen s⁻¹ m⁻², NL) angezogen, und dann 18h Starklicht (850µmol Photonen s⁻¹ m⁻², HL) bzw. Dunkelheit (D) ausgesetzt. 30µg Gesamtprotein wurde mit nichtreduzierendem Ladepuffer (-DTT) bzw. reduzierendem Ladepuffer (+DTT) versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Western Blotting wurde die Membran mit dem OHP1-Antikörper inkubiert. Monomeres OHP1 (OHP1m) bzw. OHP1-Addukte sind gekennzeichnet. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit der RuBisCO gezeigt. **C**, Analyse des Redoxstatus' von OHP1 in den Komplementationslinien. Gezeigt sind ausschließlich Proteinextrakte ohne DTT. Für Details vgl. **B**. Asteriske bezeichnen unspezifische Signale.

3.1.2 Phosphorylierung von OHP2

Die Phosphorylierung ist eine verbreitete Form der posttranslationalen Kontrolle von Proteinaktivitäten (JOHNSON 2009). Die durch die Phosphatgruppe eingeführte negative Ladung kann z. B. zu Konformationsänderungen des Zielproteins führen oder die Bindung von Interaktionspartnern beeinträchtigen. In der Datenbank PHOSPHAT 4.0 (HEAZLEWOOD *et al.* 2008) war für OHP2 ein in einem Hochdurchsatz-Screen experimentell nachgewiesenes Phosphopeptid verzeichnet (Sequenz: $^{52}\text{RP}(\text{pS})\text{APPTLR}^{60}$), welches die Phosphatgruppe am Serin 54 der Aminosäuresequenz enthielt. Zur Überprüfung der Phosphorylierung von OHP2 allgemein und der potentiellen Phosphorylierungsstelle im Besonderen wurde ein Kinase-Assay mit rekombinantem OHP2-Protein durchgeführt (Abb. 3.4). Dazu wurde rekombinant exprimiertes OHP2-Protein in Gegenwart von $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ mit Chloroplastenextrakten bzw. einer Thylakoidmembransuspension inkubiert, und anschließend die gebundene Radioaktivität autoradiographisch bestimmt (nach BELLAFFIORE *et al.* 2005).

Zur Evaluierung des Serins 54 als Phosphorylierungsstelle wurde neben dem Wildtyp-Protein (WT) mit einer OHP2-Variante gearbeitet, in der das Serin durch ein Alanin – einer nicht-phosphorylierbaren Aminosäure – ersetzt wurde (S54A). Die Inkubation der Proteine mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ in Abwesenheit von Pflanzenextrakten führte nicht zu einem detektierbaren Radioaktivitätssignal, weshalb eine Autophosphorylierung ausgeschlossen werden kann. Gleichzeitig bestätigte die Coomassiefärbung des Gels den Einsatz gleicher Proteinmengen beider OHP2-Varianten, sodass die beobachteten Intensitätsunterschiede direkt auf unterschiedliche Phosphorylierungseffizienzen rückführbar sind: OHP2-S54A zeigte ein deutlich schwächeres Signal in der Autoradiographie als OHP2-WT. Dies war sichtbar sowohl beim Einsatz von Chloroplastenextrakten als auch von Thylakoidmembranen. Dass die Phosphorylierung bei der ausschließlichen Verwendung von Thylakoidmembranen, d.h. in Abwesenheit der Stromafraktion, immer noch möglich war, deutet auf die Aktivität einer membrangebundenen Kinase hin. Weiterhin fiel auf, dass das Phosphorylierungssignal bei der Inkubation im Licht deutlich schwächer war. Dies ist allerdings (wie in der Coomassiefärbung zu erkennen) auf verringerte Proteinmengen zurückzuführen, da es zu einer Degradation des rekombinanten Proteins im Licht in Gegenwart der Pflanzenextrakte kam.

Obwohl die OHP2-S54A-Variante ein deutlich schwächeres autoradiographisches Signal im Gegensatz zu OHP2-WT zeigte, war die Phosphorylierung des Proteins nicht vollständig unterbunden. Wenn man eine unspezifische Phosphorylierung aufgrund der hohen Proteinmenge ausschließt, ist eine mögliche Erklärung, dass das OHP2-Protein noch eine oder mehrere zusätzliche Phosphorylierungsstellen besitzt, welche in bisherigen Hochdurchsatz-Analysen nicht detektiert wurden. Zur Funktionsanalyse der Phosphorylierung müssten diese ebenfalls identifiziert und ausgetauscht werden. Anschließend könnten entsprechende Komplementationskonstrukte Aufschluss über die biologische Funktion der Phosphorylierungsstellen liefern.

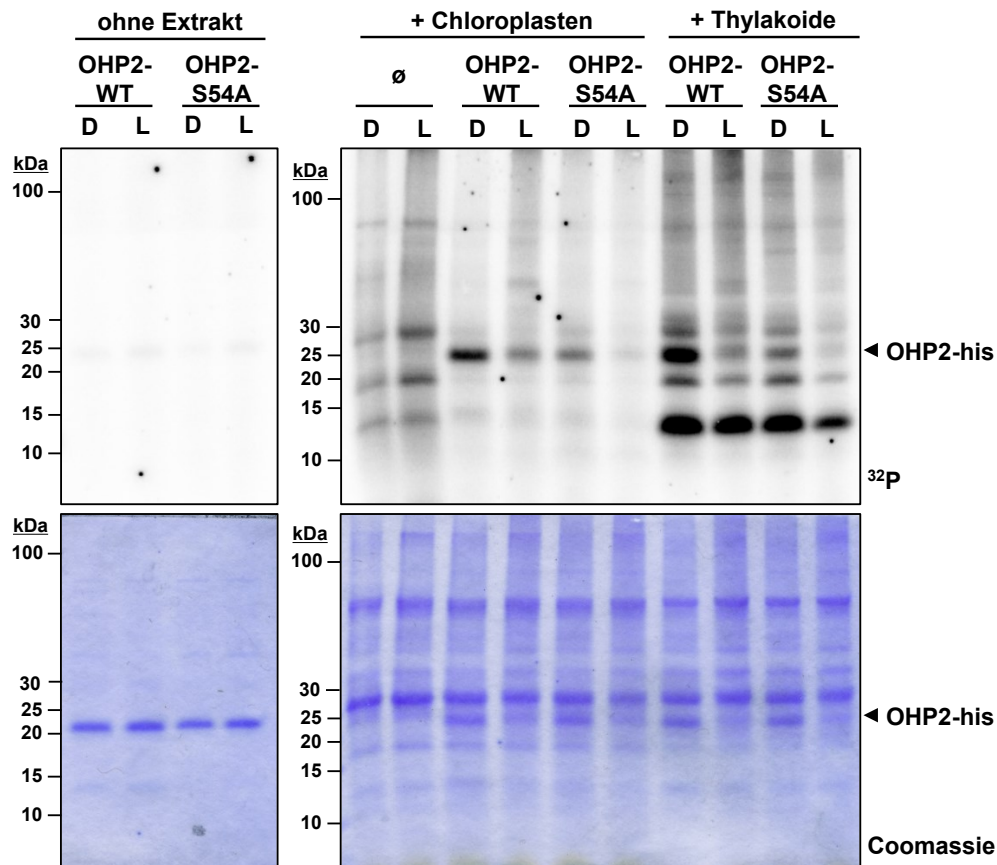


Abbildung 3.4: Phosphorylierungsassay mit rekombinantem OHP2-Protein. OHP2 wurde mit Chloroplasten- bzw. Thylakoidmembranextrakten versetzt und anschließend in Gegenwart von $0,1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (BELLAFIORE *et al.* 2005). Jeder Ansatz wurde einmal in Dunkelheit (D) und einmal im Licht (L, ca. $50\mu\text{E}$) gehalten. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Ansätze mit Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und die mit ^{32}P markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert. Um eine Autophosphorylierung der Proteine auszuschließen, wurden diese mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ aber ohne Zugabe von Pflanzenextrakten inkubiert. Die einzelnen Gelspuren sind entsprechend der Zusammensetzung des jeweiligen Ansatzes beschriftet. Dies umfasst den verwendeten Pflanzenextrakt, die OHP-Proteinvariante sowie die Lichtbedingung.

3.2 Verbindung der OHPs zur Chlorophyllbiosynthese

Die Abwesenheit von OHP1 und OHP2 (VIGS-OHP2) führte zur Destabilisierung diverser Proteine der Chl-Biosynthese (HEY *et al.* 2018a), die Abwesenheit von OHP1 alleine dagegen hatte (zumindest in VIGS-OHP1) keinen Einfluss auf die Stabilität der untersuchten Proteine. In VIGS-OHP2 war die beobachtete Destabilisierung von Chl-Biosyntheseezymen vermutlich unspezifisch und steht damit im Gegensatz zu den VIGS-LIL3.1/LIL3.2-Linien bzw. der *lil3.1/lil3.2*-Doppelmutante, in welchen eine spezifische Destabilisierung von CHLP und POR beobachtet werden konnte (HEY *et al.* 2017). Sowohl im Fall des Silencings von *OHP2* (VIGS-OHP2) als auch beider *LIL3*-Gene (VIGS-LIL3.1/LIL3.2) ging die Destabilisierung der TP-BS-Proteine mit einer reduzierten ALA-Syntheserate einher (HEY *et al.* 2017; HEY *et al.* 2018a).

Von Interesse war daher, ob sich im Umkehrschluss die Proteingehalte von OHP1 und OHP2 in Mutanten der Chl-Biosynthese, d.h. unter Bedingungen reduzierter Chl-Verfügbarkeit, verändern würden. Für LHCPs ist bekannt, dass sie unter diesen Bedingungen (z. B. in *chlm* und *chl27*) destabilisiert werden (TOTTEY *et al.* 2003; PONTIER *et al.* 2007). Die Analyse der Chl-defizienten Mutanten *gun4-3*, *gun5-1* (CHLH-Untereinheit der MgCh), *chlm*, *chl27* (MgCY) und *porb* zeigte jedoch mit Ausnahme von *gun4-3* keine signifikante Veränderung in den Gehalten von OHP1 und OHP2 im Vergleich zum WT (Abb. 3.5 A). In *gun4-3* war lediglich eine leichte Reduktion beider Proteine zu beobachten. Die Akkumulation von OHP1 und OHP2 scheint daher im Wesentlichen unabhängig von der Chl-Verfügbarkeit zu sein.

Weiterhin wurden die *ohp*-Mutanten auf 1/2-MS-Medium unter Zugabe von 100µM ALA angezogen. Cyanobakterielle Hlip⁻-Mutanten sind durch eine beeinträchtigte ALA-Synthese gekennzeichnet (YAO *et al.* 2012). Sollte die Versorgung mit ALA ein limitierender Faktor für die Entwicklung der *ohp*-Mutanten sein, müsste durch die Anzucht in Anwesenheit von ALA eine (partielle) Komplementation des Phänotyps beobachtet werden können. Dies konnte im Fall der *gun4*-Mutante tatsächlich erreicht werden (PETER *et al.* 2009). Der Vergleich des Wachstums der mit und ohne ALA angezogenen *ohp*-Mutanten zeigte jedoch nicht diesen Effekt (Abb. 3.5 B). Die Entwicklung von *ohp2* schien im Gegenteil noch weiter beeinträchtigt zu sein, möglicherweise durch die Akkumulation phototoxischer Intermediate. Zu beachten ist allerdings, dass die Mutanten (im Gegensatz zu den weiter unten beschriebenen Experimenten) ohne Zugabe von Saccharose im Medium wuchsen. Insbesondere der Phänotyp von *ohp2* verschlimmerte sich im Vergleich zu den auf Saccharose angezogenen Pflanzen.

LIL3 interagiert mit einer Vielzahl an Proteinen der TP-BS (HEY *et al.* 2017). Die Anwendung von BiFC und Pulldown-Experimenten erbrachte dagegen keine Hinweise auf Interaktionen der OHPs mit Enzymen der TP-BS (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion zu CHLG konnte wie beschrieben ebenfalls nicht bestätigt werden (HEY *et al.* 2018a). Experimente mit *Synechocystis*-Proteinextrakten belegten eine Hlip-CHLG-Interaktion, das pflanzliche CHLG-Protein interagiert aber nicht mit den Hlips (PROCTOR *et al.* 2018). Wenn das OHP1-OHP2-Heterodimer tatsächlich wie vermutet an der Anlieferung von Chl für neu synthetisierte D1-Proteine zuständig ist, aber nicht direkt mit CHLG interagiert, lässt sich die Frage stellen, woher die entsprechenden Chl-Moleküle stammen. LIL3 wäre als mögliche Quelle von Chl-Molekülen denkbar, da für LIL3 eine Transportfunktion für Intermediate im Rahmen der TP-BS, aber auch für Chl postuliert wurde (REISINGER *et al.* 2008; HEY *et al.* 2017).

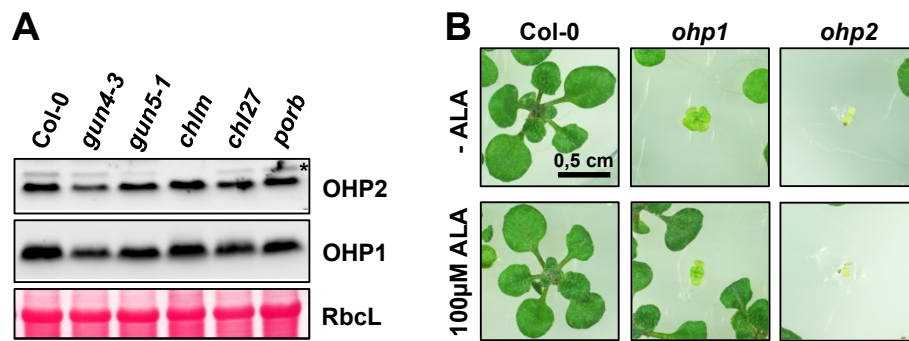


Abbildung 3.5: Untersuchung einer Verbindung der OHPs zur Chlorophyllbiosynthese. A, Western Blot-Analyse der OHP-Proteine in Mutanten des Chl-Zweigs der TP-BS. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt. B, Anzucht der (heterozygoten) *ohp*-Mutanten unter Supplementation von ALA. Die Linien wurden auf 1/2-MS-Medium ohne Zugabe von Saccharose 3 Wochen unter Dauerlicht-Bedingungen ($100 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$) angezogen. Wo angegeben wurde dem Medium $100 \mu\text{M}$ ALA zugesetzt. Homozygote Einzelpflanzen der *ohp*-Linien sind gezeigt.

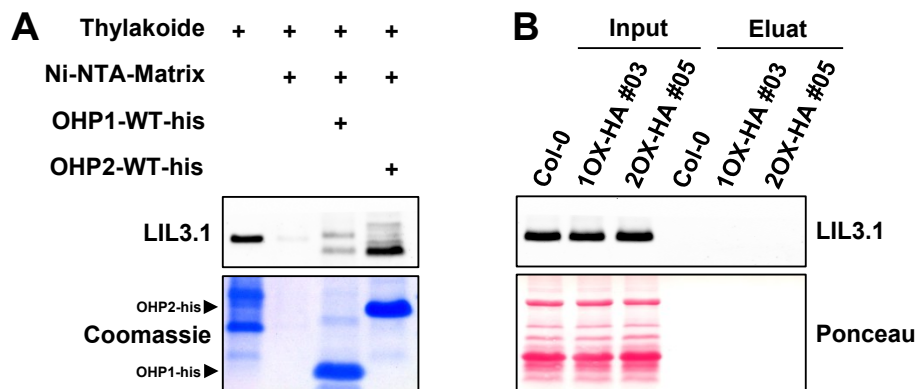


Abbildung 3.6: Untersuchung der OHP-LIL3-Interaktion. A, His-Tag-Pulldown zur Überprüfung der Interaktion von OHP1 und OHP2 mit LIL3 mittels rekombinant exprimierter OHP1-WT und OHP2-WT-Proteine. $100 \mu\text{g}$ rekombinantes Protein wurde an $50 \mu\text{l}$ Ni-NTA-Matrix gebunden und anschließend mit solubilisierten Thylakoiden inkubiert ($100 \mu\text{g}$ Chl, solubilisiert mit 0,5% DDM). Nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit 250mM Imidazol eluiert und elektrophoretisch aufgetrennt. B, StrepII-Tag-Pulldown zur Überprüfung der Interaktion von OHP1 und OHP2 mit LIL3. Thylakoide aus den OHP-HA-OX-Linien (HEY *et al.* 2018a) wurden mit 0,5% DDM solubilisiert und mit Streptavidin-bindender Matrix inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit 10mM Desthiobiotin eluiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration im Eluat sind keine Banden in der Ponceau-Färbung sichtbar.

Um eine mögliche OHP-LIL3-Interaktion zu untersuchen, wurden Pulldown-Experimente durchgeführt. Dabei ergab sowohl der Einsatz rekombinanter OHP-Proteine als Köder, als auch die Aufreinigung *in planta*-exprimierter, StrepII-getaggtter OHP-Proteine (OHP1/2-(HA)-OX-Linien, vgl. HEY *et al.* (2018a)) kein detektierbares LIL3-Protein im Eluat (Abb. 3.6 A,B). Bei Einsatz der rekombinanten OHPs für Pulldown-Experimente waren zwar Signale des LIL3.1-Antikörpers in den Eluaten detektierbar (Abb. 3.6 A), diese entsprachen jedoch nicht der Größe des endogenen LIL3.1-Proteins und sind daher als unspezifisch anzusehen. Es könnte sich bei den unspezifischen Signalen z. B. um Kreuzreaktionen des α -LIL3.1-Antikörpers mit aus der Aufreinigung der rekombinanten OHP-Proteine stammenden *E. coli*-Proteinen handeln.

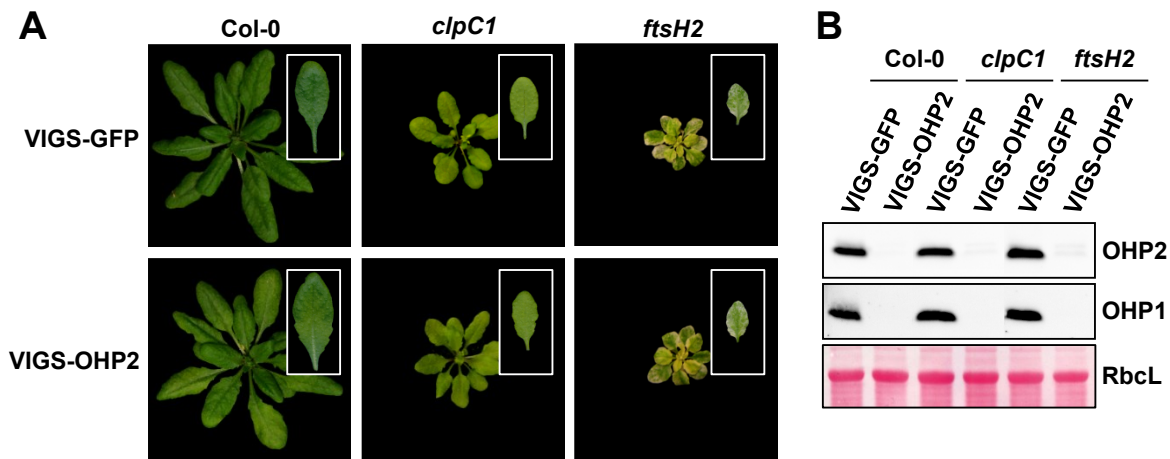


Abbildung 3.7: Analyse der Stabilität von OHP1 in Protease-Mutanten. Der WT Col-0 sowie die Mutantenlinien *clpC1* (Chaperon-Untereinheit der Clp-Protease, SJÖGREN *et al.* 2004) und *ftsH2* (bzw. *var2*, CHEN *et al.* 2000) wurden unter Langtag-Bedingungen angezogen (16h Licht, $100\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$) und wie in HEY *et al.* (2017) beschrieben mit VIGS-Konstrukten infiltriert. **A**, Phänotyp fünf Wochen alter VIGS-Pflanzen. **B**, Western Blot-Analyse der OHPs. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt.

3.3 Analyse der Stabilität von OHP1 in Protease-Mutanten

Der Verlust von OHP2 geht stets mit einer posttranslationalen Destabilisierung von OHP1 einher (BECK *et al.* 2017; HEY *et al.* 2018a). Unter der Annahme, dass *OHP1* exprimiert und das Protein in die Chloroplasten importiert wird, so muss dort eine proteolytische Aktivität für den Abbau von OHP1 in Abwesenheit von OHP2 (bzw. von HCF244) verantwortlich sein (vgl. dazu auch Abschnitt 3.7.2.4). Chloroplasten besitzen diverse proteolytische Aktivitäten wie das Clp-Protease-System, das u.a. für die Degradation der GluTR verantwortlich ist (APITZ *et al.* 2016), sowie die FtsH-Proteasen (FtsH1/5 bzw. FtsH2/8), die am PSII-Reparaturzyklus beteiligt sind (NISHIMURA *et al.* 2016). Sollte eines dieser beiden Systeme für die Degradation von OHP1 in Abwesenheit von OHP2 zuständig sein, dann dürfte OHP1 nach Infiltration der entsprechenden Mutantenlinien mit einem VIGS-OHP2-Konstrukt nicht abgebaut werden können, sondern sollte weiterhin stabil und detektierbar sein.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden *clpC1* und *ftsH2* (bzw. *var2*) mit dem VIGS-OHP2-Konstrukt infiltriert (vgl. HEY *et al.* 2018a) und die Proteinlevel von OHP1 und OHP2 bestimmt. Der makroskopische Phänotyp der VIGS-OHP2-infiltrierten Mutanten veränderte sich überraschenderweise im Vergleich zu den VIGS-GFP-infiltrierten Kontrollpflanzen nicht (Abb. 3.7 A). Dies stand im Gegensatz zum WT, der erwartungsgemäß bei Infiltration mit VIGS-OHP2 einen deutlich verringerten Chl-Gehalt aufwies. Die Analyse der Proteinlevel zeigte, dass der VIGS-Ansatz in allen drei Fällen erfolgreich war, und kein detektierbares OHP2 zurückblieb (Abb. 3.7 B). Allerdings war wie im WT auch in den beiden Protease-Mutanten ebenfalls kein OHP1 mehr detektierbar. Das ClpC1-Chaperon und FtsH2 können daher als für die Erkennung bzw. den Abbau von OHP1 zuständige Proteasen ausgeschlossen werden. Zur Identifizierung der verantwortlichen Protease sollten weitere Mutanten mit VIGS-OHP2 infiltriert, und auf den Gehalt an OHP1 untersucht werden. Alternativ könnten Doppel-VIGS-Konstrukte für *OHP2* und jeweils eine Protease erstellt, und in den WT infiltriert werden.

3.4 Konstitutives Silencing und Überexpression der *OHP*-Gene

Während homozygote Nachkommen der *ohp1*- und *ohp2*-Mutanten nur auf MS-Medium unter Zugabe von Saccharose überlebensfähig waren (BECK *et al.* 2017; MYOUGA *et al.* 2018), erforderte die Anzucht der VIGS-Pflanzen eine stetige Infiltration jeder neuen Aussaat. Zudem konnte die Anzucht der VIGS-Pflanzen nur unter Langtag-Bedingungen erfolgen. Hinzu kam, dass die VIGS-*OHP1*-Pflanzen im Gegensatz zur *ohp1*-Mutante keinen makroskopisch vom WT verschiedenen Phänotyp aufwiesen. Vermutlich lässt sich diese Beobachtung durch das in VIGS-*OHP1* erst relativ spät (d.h. nach den initialen Phasen der Keimung) einsetzende Silencing von *OHP1* erklären: Dies würde eine möglicherweise wichtige Funktion von *OHP1* in der frühen Keimlingsentwicklung in VIGS-*OHP1* zulassen, während diese Funktion in den *ohp1*-Linien fehlen sollte (HEY *et al.* 2018a). Um den Einfluss des Fehlens von *OHP1* direkt von der Keimung ausgehend untersuchen zu können, dabei aber die drastischen Effekte eines *OHP1-Knockouts* zu umgehen, wurden *OHP1*-RNAi-Linien erzeugt (Abschnitt 3.4.1). Weiterhin war von Interesse, welchen Einfluss eine konstitutive Überexpression der *OHP*-Gene auf das Pflanzenwachstum haben würde. Da eine Überexpression von *OHP*-Fusionskonstrukten mit einem C-terminalen HA-strepII-Tag zu kaum detektierbarer Akkumulation des Fusionsproteins führte (HEY *et al.* 2018a), wurden ebenso Linien ohne Peptid-Tag erzeugt (Abschnitt 3.4.2).

3.4.1 *OHP1*-RNAi-Linien

Zur Erstellung der *OHP1*-RNAi-Linien wurde ein 277bp-Fragment der *OHP1*-cDNA (bp 57–333) in Form eines *inverted repeats* (mit verbindendem Linker) unter der Kontrolle des 35S-Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimiert.

3.4.1.1 Phänotyp der *OHP1*-RNAi-Linien

Die erzeugten Linien zeigten zum Teil einen drastischen makroskopischen Phänotyp, der durch ein stark verzögertes Wachstum sowie eine augenscheinlich deutlich schwächere Pigmentierung im Vergleich zum WT gekennzeichnet war (Abb. 3.8 A). Dabei war die Wachstumsverzögerung unter Kurztag-Bedingungen deutlich offensichtlicher als bei der Anzucht im Dauerlicht. Die Analyse der *OHP*-Transkripte mittels quantitativer Real-Time PCR zeigte, dass in den ausgewählten *OHP1*-RNAi-Linien maximal 5% der WT-*OHP1*-Transkriptmenge nachweisbar war, während *OHP2* unter den Wachstumsbedingungen eine leichte Akkumulation aufwies (Abb. 3.8 B). Die starke Reduktion der *OHP1*-mRNA führte dazu, dass kein *OHP1*-Protein mehr detektierbar war (Abb. 3.8 C). Der *OHP2*-Proteingehalt war verringert, auch wenn sich eine eindeutige Aussage über den Grad der Verringerung schwieriger gestaltete: Zum Teil wurde eine drastisch verringerte Menge an *OHP2* nachgewiesen, während bei anderen Wiederholungen des Experiments nahezu unveränderte *OHP2*-Level beobachtet werden konnten. Der Gehalt an HCF244 war in Übereinstimmung mit der *ohp1*-Mutante ebenfalls stark reduziert (LI *et al.* 2018).

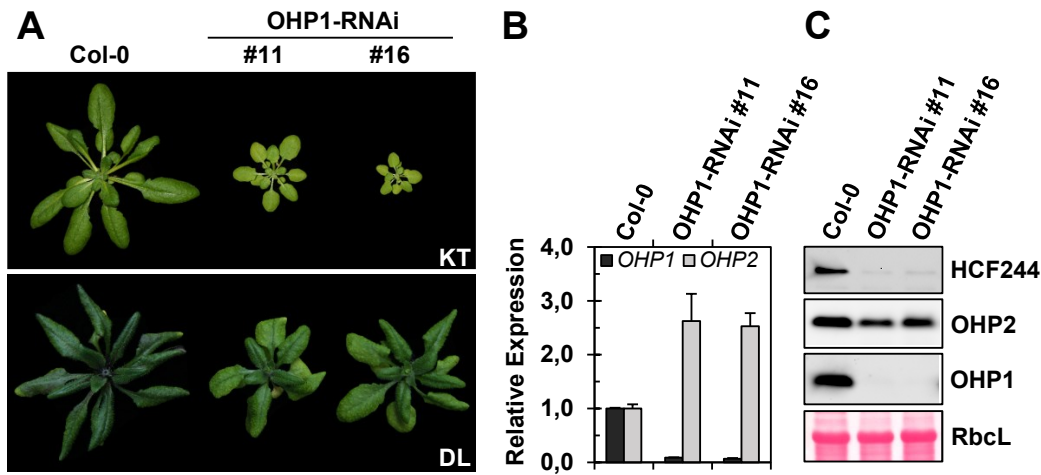


Abbildung 3.8: Phänotyp der OHP1-RNAi-Linien. A, Phänotyp vier Wochen alter Pflanzen zweier ausgewählter OHP1-RNAi-Linien. Die Pflanzen wuchsen auf Erde unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht, $100\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$; KT) bzw. im Dauerlicht ($100\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$; DL). B, Quantitative PCR der OHP-Gene in den zwei ausgewählten Linien. Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA für die qRT-PCR eingesetzt. C, Western Blot-Analyse. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt.

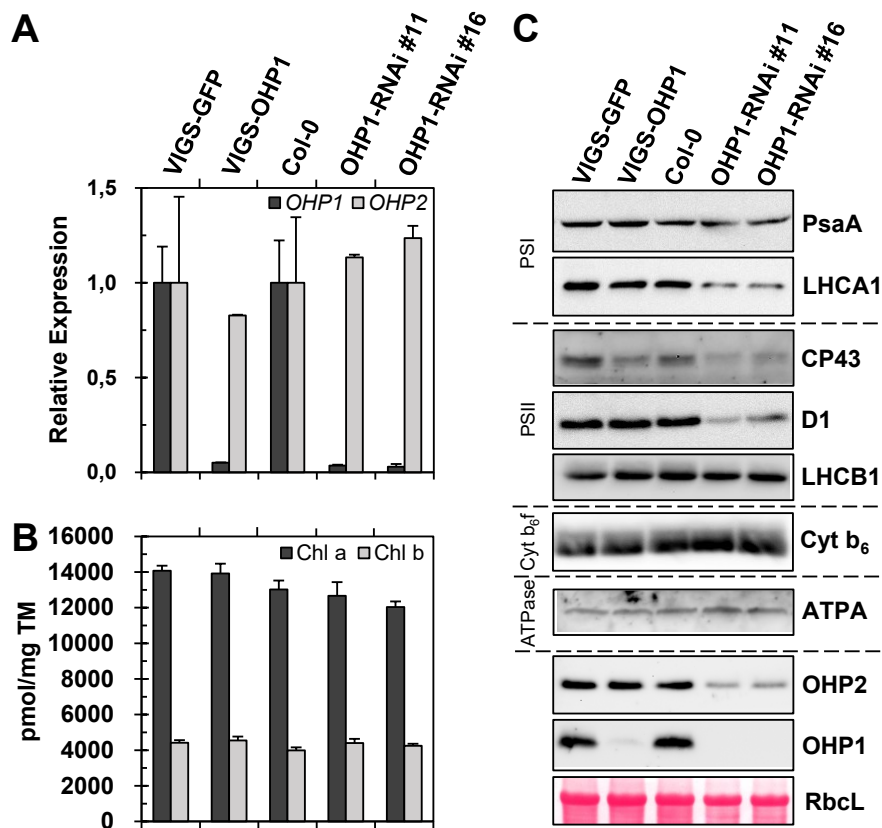


Abbildung 3.9: Vergleich von OHP1-RNAi und VIGS-OHP1. Die Pflanzen wurden für dieses Experiment unter Langtag-Bedingungen angezogen (16h Licht , $100\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$). A, Quantitative PCR der OHP-Gene. Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA für die qRT-PCR eingesetzt. B, Analyse der Chlorophyllgehalte mittels HPLC. Pigmente wurden mit basischem Aceton aus gefriergetrockneten Blattproben extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung geschah im Vergleich mit reinen Standards. TM: Trockenmasse. C, Western Blot-Analyse der OHPs und Untereinheiten der Photosynthese-Komplexe. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt.

3.4.1.2 Vergleich von *OHP1*-RNAi und VIGS-*OHP1*

Die *OHP1*-RNAi-Linien verhielten sich ähnlich wie die *ohp1*-Mutante – d.h. sie zeigten ein verzögertes Wachstum und augenscheinlich verringerte Chl-Gehalte – aber ohne einen Verlust der Photoautotrophie aufzuweisen. Der schwächere Phänotyp im Vergleich zu *ohp1* lässt sich vermutlich damit erklären, dass noch (undetektierbare) Restmengen an *OHP1* vorhanden sind. Andererseits verhielten sich die RNAi-Linien deutlich verschieden zu den VIGS-*OHP1*-Pflanzen, obwohl beide Systeme grundsätzlich ähnlich funktionieren und beide Konstrukte zu einer vergleichbar starken Reduktion des *OHP1*-Transkripts auf maximal 5% der WT-*OHP1*-Menge führten (Abb. 3.9 A).

Eine HPLC-Analyse der Chl-Gehalte zeigte, dass die VIGS-*OHP1*-Linien wie bereits beschrieben keinen Unterschied in der Chl-Akkumulation aufwiesen (Hev *et al.* 2018a). Andererseits zeigten überraschenderweise auch die *OHP1*-RNAi-Linien bei der Messung mittels HPLC und Normierung auf Trocken- oder Frischmasse (Daten für letztere nicht gezeigt) trotz der deutlich helleren Blattfärbung keine signifikante Abweichung vom WT (Abb. 3.9 B). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Blätter von *OHP1*-RNAi dünner sind als die des WT, sodass bei gleicher Blattfläche zwar weniger Chl vorhanden ist, dies aber durch das geringere Gewicht einer definierten Blattfläche im Vergleich zum WT ausgeglichen wird: Somit müsste für die gleiche Menge an Blattmasse mehr Blattfläche von *OHP1*-RNAi geerntet werden. Die Analyse der Proteinlevel von Untereinheiten der verschiedenen photosynthetischen Komplexe ergab, dass D1 und CP43 in *OHP1*-RNAi verringert war (Abb. 3.9 C), und ebenfalls LHCA1 eine verringerte Akkumulation aufwies. In diesen Experimenten war auch *OHP2* in beiden *OHP1*-RNAi-Linien deutlich verringert. Sämtliche anderen untersuchten Proteine wiesen in *OHP1*-RNAi keinen Unterschied zum WT auf, während in VIGS-*OHP1* wie beschrieben keine Abweichungen von der VIGS-GFP-Kontrolle sichtbar waren.

Die unterschiedliche Auswirkung des Fehlens von *OHP1* liegt demnach wahrscheinlich nicht an der Menge des verbleibenden *OHP1*-Transkripts bzw. *OHP1*-Proteins, sondern am Zeitpunkt des Silencings. Da die Infiltration mit dem VIGS-Konstrukt im 4-Blatt-Stadium vorgenommen wird, muss der entscheidende Zeitpunkt für die Bedürftigkeit des Vorhandenseins von *OHP1* im Zeitraum der Keimlingsentwicklung vor der Infiltration liegen.

3.4.2 *OHP1*- und *OHP2*-Überexpressionslinien im Wildtyp-Hintergrund

In den *OHP1*-OX bzw. *OHP2*-OX-Linien wurden die entsprechenden CDS' unter Kontrolle des 35S-Promotors im WT-Hintergrund exprimiert. Dazu wurde das gleiche Vektor-Gerüst wie für die Linien mit HA-strepII-Tag genutzt, nur dass die Translation des Tags durch ein eingeführtes Stopcodon unterbunden wurde.

3.4.2.1 Phänotyp der *OHP1*- und *OHP2*-OX-Linien

Sowohl die *OHP1*-OX als auch die *OHP2*-OX-Linien waren phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 3.10 A). Die Quantifizierung der entsprechenden *OHP*-Transkripte mittels

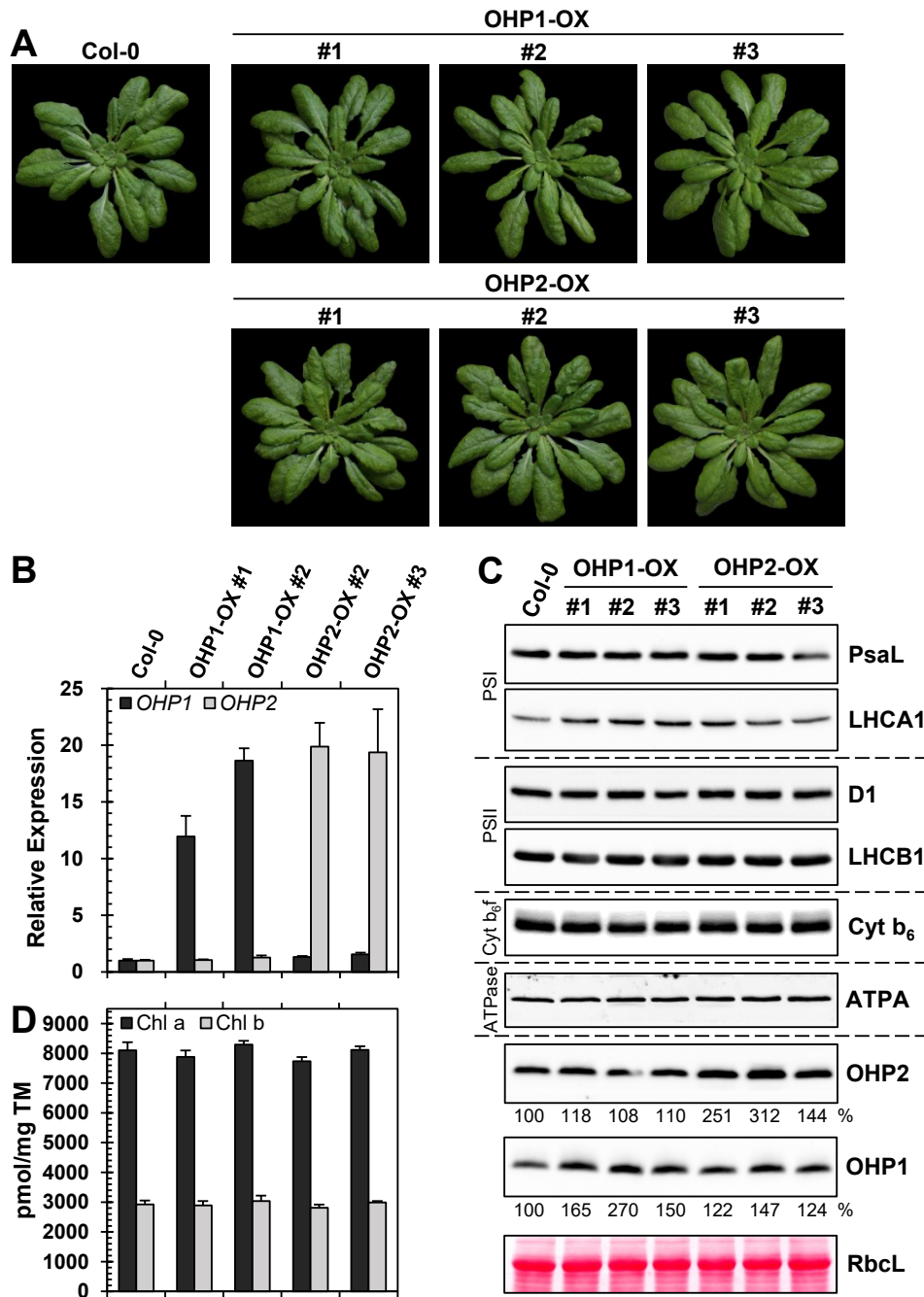


Abbildung 3.10: Phänotyp und Charakterisierung der OHP1- und OHP2-Überexpressionslinien. A, Phänotyp fünf Wochen alter Pflanzen der OHP1-OX bzw. OHP2-OX-Linien. Die Pflanzen wuchsen auf Erde unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht, $100\mu\text{mol Photonen s}^{-1}\text{m}^{-2}$). B, Quantitative PCR der *OHP*-Gene in zwei ausgewählten Linien. Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA für die qRT-PCR eingesetzt. C, Western Blot-Analyse der OHPs und Untereinheiten der Photosynthese-Komplexe. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Die Zahlen unterhalb des OHP1- und OHP2-Signals geben die densitometrisch bestimmten Signalintensitäten wieder. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt. D, Analyse der Chl-Gehalte mittels HPLC. Pigmente wurden mit basischem Aceton aus gefriergetrockneten Blattproben extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung geschah im Vergleich mit reinen Standards. TM: Trockenmasse.

quantitativer Real-Time-PCR zeigte eine Akkumulation auf das 12- bis 18-fache der WT-*OHP1*-Menge in *OHP1*-OX, wohingegen die untersuchten *OHP2*-OX-Linien etwa das 20-fache der WT-*OHP2*-Transkriptmengen akkumulierten (Abb. 3.10 B). Die Überexpression hatte dabei keinen Einfluss auf die Expression der jeweils anderen *OHP*-mRNA. Trotz der starken Anreicherung der Transkripte war der Proteingehalt des korrespondierenden *OHP*-Proteins nur moderat erhöht und erreichte in den *OHP1*-OX-Linien maximal etwa 250% der WT-*OHP1*-Menge, während in *OHP2*-OX nicht mehr als etwa 300% des WT-*OHP2*-Gehalts akkumulierte (Abb. 3.10 C). Das jeweils andere *OHP* wies in der Regel eine unveränderte bis leicht erhöhte Proteinmenge auf. Die makroskopisch unveränderte Pigmentierung der Überexpressionslinien konnte durch Bestimmung des Chl-Gehalts mittels HPLC bestätigt werden: Alle untersuchten Linien wiesen keinen Unterschied zum WT auf (Abb. 3.10 D).

3.4.3 *OHP1*- und *OHP2*-Überexpressionslinien im *hcf244*-Hintergrund

In Abwesenheit von HCF244 (*hcf244*-Mutante bzw. VIGS-HCF244) kann eine Destabilisierung von *OHP1* und *OHP2* beobachtet werden, wobei *OHP2* stark verringert ist und kaum noch detektierbare *OHP1*-Mengen zurückbleiben (HEY *et al.* 2018a). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die Überexpression der *OHP*-Gene im *hcf244*-Hintergrund zu einer erhöhten oder sogar WT-ähnlichen Akkumulation der *OHP*-Proteine führen könnte, und ob dies unter Umständen eine partielle Komplementation des *hcf244*-Phänotyps ermöglichen würde. Es wurden die selben Vektoren zur Transformation verwendet, welche auch für die Erstellung der Überexpressionslinien im WT-Hintergrund eingesetzt wurden.

3.4.3.1 Phänotyp der *hcf244/OHP1*- und *hcf244/OHP2*-OX-Linien

Die Überexpression von *OHP1* bzw. *OHP2* im *hcf244*-Mutantenhintergrund führte zu transgenen Linien mit dem gleichen makroskopischen Phänotyp wie *hcf244* (Abb. 3.11 A). Dieser zeichnet sich durch gedrungeneres Wachstum sowie eine schwächere Pigmentierung im Vergleich zum WT aus. Ein verringerter Chl-Gehalt von etwa 75% des WTs war in der *hcf244*-Mutante sowie in den Überexpressionslinien nachweisbar. Letztere Linien akkumulierten keine signifikant von *hcf244* verschiedenen Chl-Mengen (Abb. 3.11 B). Auf Proteinebene war eine Zunahme des jeweils überexprimierten Proteins nachweisbar. Die transgenen Linien erreichten aber in keinem Fall WT-Mengen der *OHP*s: Während in *hcf244* etwa 18% *OHP2* im Vergleich zum WT verblieben, konnte dieser Anteil in den *hcf244/OHP2*-OX-Linien auf etwa 60-80% der WT-*OHP2*-Menge erhöht werden (Abb. 3.11 C). Interessanterweise blieb gleichzeitig der *OHP1*-Gehalt unverändert. Die Überexpression von *OHP1* führte lediglich zu marginal von etwa 3% auf 10% der WT-Gehalte erhöhten *OHP1*-Mengen. Vermutlich steht nicht genug *OHP2* zur Verfügung, um höhere Mengen an *OHP1* zu stabilisieren, denn der *OHP2*-Gehalt blieb unverändert. Wie schon am gleichbleibenden makroskopischen Phänotyp zu erkennen, führte die erhöhte *OHP2*-Menge in den *hcf244/OHP2*-OX-Linien nicht zu einer Komplementation des *hcf244*-Phänotyps. Dies spiegelte sich auch in den unverändert niedrigen D1-Mengen in der Mutante und den Überexpressionslinien wider (Abb. 3.11 C).

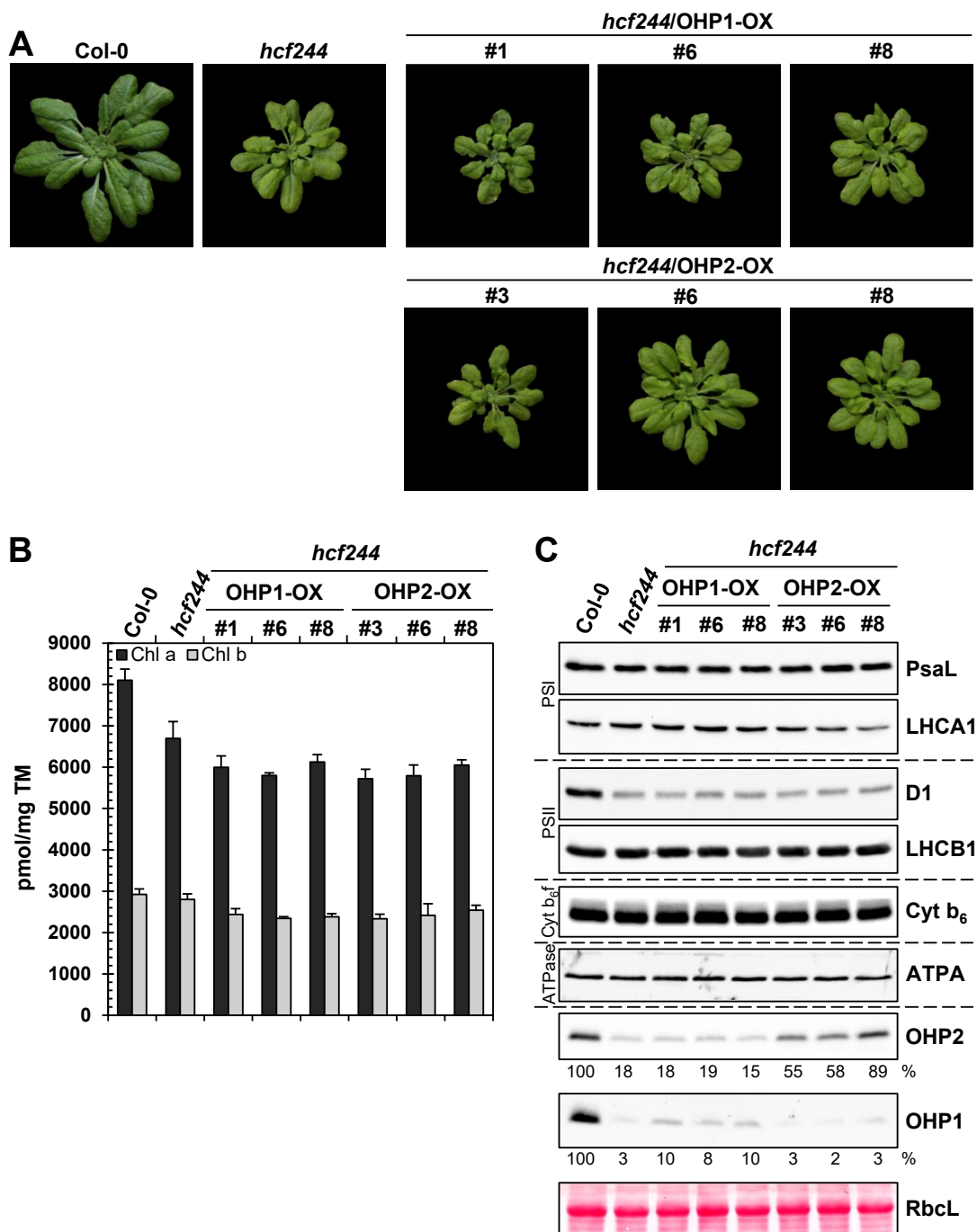


Abbildung 3.11: Phänotyp und Charakterisierung der OHP1- und OHP2-Überexpressionslinien im *hcf244*-Hintergrund. **A**, Phänotyp fünf Wochen alter Pflanzen der *hcf244*/OHP1-OX bzw. *hcf244*/OHP2-OX-Linien. Die Pflanzen wuchsen auf Erde unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht, $100\mu\text{mol Photonen s}^{-1}\text{m}^{-2}$). **B**, Analyse der Chl-Gehalte mittels HPLC. Pigmente wurden mit basischem Aceton aus gefriergetrockneten Blattproben extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung geschah im Vergleich mit reinen Standards. TM: Trockenmasse. **C**, Western Blot-Analyse der OHPs und Untereinheiten der Photosynthese-Komplexe. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Die Zahlen unterhalb des OHP1- und OHP2-Signals geben die densitometrisch bestimmten Signalintensitäten wieder. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt.

3.5 Funktion von OHP1 und OHP2 unter Stressbedingungen

Wie in HEY *et al.* (2018a) gezeigt, führte die Abwesenheit von OHP1 und OHP2 (VIGS-OHP2) zu einer starken Anfälligkeit gegenüber hohen Lichtintensitäten. Bei Inkubation von Blattscheiben im Starklicht (sowohl mit als auch ohne Lincomycin) wurde eine gegenüber der VIGS-GFP-Kontrolle beschleunigte Destabilisierung des D1-Proteins beobachtet, wobei dies vermutlich sowohl auf die stark verringerte D1-Synthesekapazität als auch auf eine erhöhte Sensitivität des D1-Proteins gegenüber Lichtstress zurückzuführen ist. Weiterhin fiel auf, dass auch die alleinige Abwesenheit von OHP1 (VIGS-OHP1) bereits zu einer verringerten D1-Synthese führte, welche aber keine Auswirkung auf das Pflanzenwachstum unter Normalbedingungen hatte.

Da OHP1 für die volle Aktivität des OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes scheinbar unerlässlich war, sollte das Vorhandensein von OHP1 (in älteren Pflanzen) insbesondere unter Stressbedingungen besonders wichtig sein. Chl-Fluoreszenz-Analysen (F_v/F_m) und die Bestimmung des D1-Proteingehalts von VIGS-OHP1 bei Starklicht-Exposition bestätigten diese Vermutung: Ab 6 Stunden Inkubation im Starklicht ($850\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$) war der D1-Gehalt in VIGS-OHP1 deutlich gegenüber der VIGS-GFP-Kontrolle verringert, was mit einem insgesamt stärker und schneller abfallenden F_v/F_m -Wert einherging (HEY *et al.* 2018b).

3.5.1 Verhalten der OHP-Expression bei Lichtstress

Um der Funktion der OHPs in Lichtstress-Situationen weiter nachzugehen, wurde das Verhalten der OHP-Genexpression und der OHP-Proteinakkumulation unter Starklicht analysiert. Im Gegensatz zu den Versuchen in HEY *et al.* (2018b) wurden dafür jüngere WT-Pflanzen eingesetzt, die gegenüber älteren Pflanzen höhere OHP-Proteinmengen enthalten (LI *et al.* 2018). Blattscheiben vom WT wurden bei $850\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert und zu definierten Zeitpunkten Proben für quantitative Real-Time PCR sowie Proteinanalysen genommen. Die Expressionsanalyse der OHP-Gene ergab, dass sowohl OHP1 als auch OHP2 eine ungefähre Verdopplung ihrer Akkumulation nach 24 Stunden Starklicht aufwiesen (Abb. 3.12 A). Im Vergleich mit dem Expressionsverhalten eines bekannterweise Starklicht-induzierten Gens wie *ELIP1* fiel auf, dass letzteres eine bedeutend stärkere Zunahme der Expression zeigte. Unter den gewählten Bedingungen stieg die *ELIP1*-Expression auf das mehr als 100-fache im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 an (Abb. 3.12 A).

Eine Zunahme der OHP1-Expression unter Starklicht wurde bereits mehrfach mit verschiedenen Techniken gezeigt (BECK *et al.* 2017; MYOUGA *et al.* 2018) und konnte hier in gewissem Umfang bestätigt werden. Die starke Zunahme in der *ELIP1*-Expression spiegelte sich auch bei der Analyse der Proteingehalte wider, da ein deutliches *ELIP1*-Signal erst bei der 24 Stunden-Probe auftrat (Abb. 3.12 B). Die Quantifizierung der OHP1- und OHP2-Signalintensitäten zeigte eine unveränderte Akkumulation von OHP2 sowie eine leichte Zunahme von OHP1 auf das 1,5-fache des Ausgangswerts. Insgesamt deckt sich diese Beobachtung mit der ebenfalls nur leichten Zunahme der OHP-Proteinlevel in älteren VIGS-GFP-Pflanzen bei gleichermaßen leicht erhöhter Transkriptakkumulation im Starklicht (HEY *et al.* 2018b).

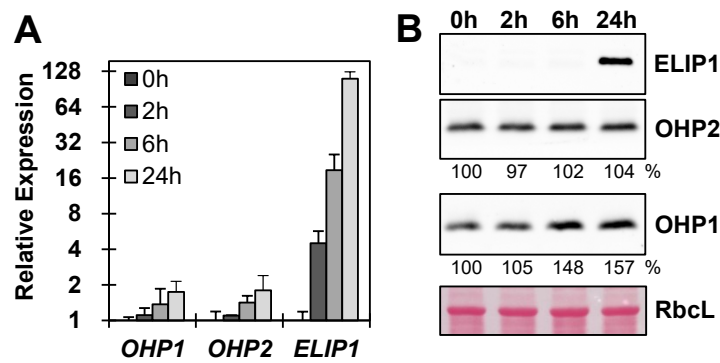


Abbildung 3.12: Expression der OHP-Gene und Proteinakkumulation unter Starklicht. Blattscheiben vom WT (Col-0) wurden auf Wasser schwimmend und durch eine 5cm starke Wasserschicht vor den Lampen geschützt bei etwa $850\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ für die angegebene Zahl an Stunden inkubiert. Anschließend wurden die RNA bzw. Proteine extrahiert. **A**, Quantitative PCR der *OHP*- und *ELIP1*-Gene. Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA für die qRT-PCR eingesetzt. **B**, Western Blot-Analyse der OHPs und ELIP1. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Die Zahlen unterhalb des OHP1- und OHP2-Signals geben die densitometrisch bestimmten Signalintensitäten wieder. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt.

3.5.2 OHP1-RNAi- und OHP1-OX bzw. OHP2-OX-Linien unter Lichtstress

Die – wenngleich auch nur marginale – Zunahme der OHP1-Proteinmenge unter Starklicht führte zur Fragestellung, ob ein konstitutiv erhöhter OHP1- bzw. OHP2-Gehalt einen positiven Einfluss auf die Stressresistenz haben würde. Um dies zu untersuchen, wurden Blattscheiben der OHP-OX-Linien wie oben beschrieben im Starklicht inkubiert. Als Kontrolle wurden zwei OHP1-RNAi-Linien mitgeführt. Dies war einerseits Linie #11 (Abb. 3.8) als Linie mit starkem Phänotyp, und andererseits Linie #44, welche eine Verringerung der *OHP1*-Expression auf weniger als 50% im Vergleich zum WT aufwies, aber keine phänotypische Veränderung zeigte (milderer Phänotyp). Zur Beurteilung des Stresslevels in den untersuchten Linien wurde zunächst der F_v/F_m -Wert über die Messung der Chl-Fluoreszenz bestimmt.

Es zeigte sich, dass die OHP1-RNAi-Linien bereits unter Normalbedingungen einen im Vergleich zum WT niedrigeren F_v/F_m -Wert aufwiesen, wobei Linie #11 besonders stark und Linie #44 nur marginal beeinträchtigt war (Abb. 3.13 A,B). In beiden RNAi-Linien sank F_v/F_m im Verlauf der Stressexposition stark ab und erreichte in Linie #11 bereits nach 8 Stunden nicht einmal mehr 10% des WT-Ausgangswerts. Auch im WT sowie in den OHP1-OX und OHP2-OX-Linien sank F_v/F_m im Verlauf des Experiments. Die OX-Linien hatten zu Beginn gleiche F_v/F_m -Werte wie der WT. Das Absinken von F_v/F_m verlief in den OX-Linien anfangs im gleichen Maße wie im WT, nach 8 und 24 Stunden wiesen sie allerdings einen leicht höheren F_v/F_m auf. Insbesondere in den OHP2-OX-Linien gab es zwischen dem 2h- und dem 8h-Zeitpunkt keine Veränderung von F_v/F_m .

Zur Einschätzung der Wirkung des Lichtstresses auf PSII wurde ebenfalls der D1-Gehalt der Linien zu den einzelnen Zeitpunkten analysiert. Im WT wurde nach 24 Stunden (im Gegensatz zu den Experimenten in Hey *et al.* 2018b) eine starke Destabilisierung von D1 beobachtet, wobei eine leichte Verringerung bereits nach 8 Stunden Starklicht auftrat (Abb. 3.13 C). Beide OHP1-RNAi-Linien zeigten dagegen eine sehr viel schnellere und vor allem drastischere D1-Destabilisierung im Zeitverlauf: Bereits 2 Stunden Lichtstress genügten, um die D1-Menge auf etwa die Hälfte des Ausgangswerts zu senken, und nach 24 Stunden verblieb kaum noch detektierbares D1-Protein.

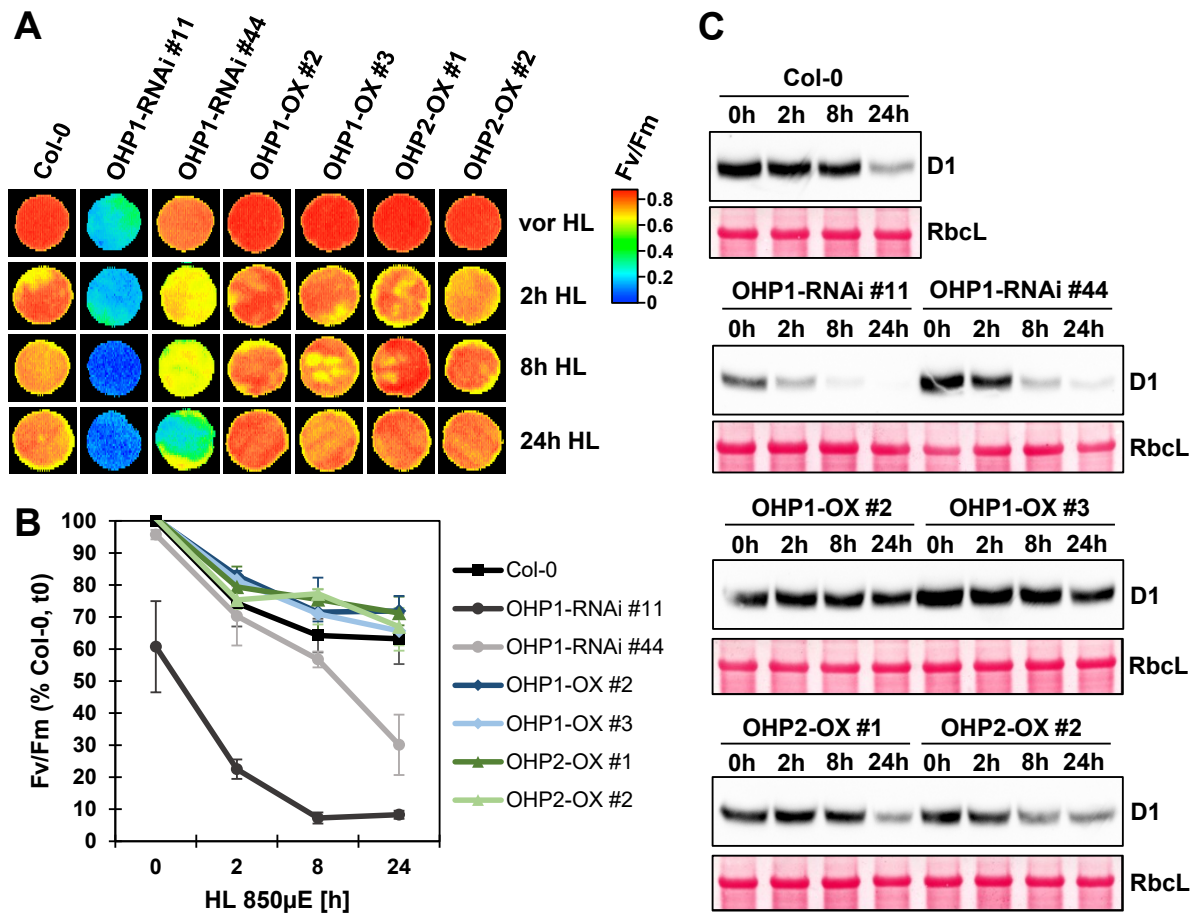


Abbildung 3.13: OHP1-RNAi- und OHP1- bzw. OHP2-OX-Linien unter Lichtstress. Blattscheiben der angegebenen Linien wurden wie oben bei $850\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ inkubiert. **A**, Falschfarbendarstellung des Fv/Fm-Wertes in den Blattscheiben. Die Chl-Fluoreszenz wurde mit einem PAM-Imager ausgelesen. Eine repräsentative Blattscheibe pro Linie und Zeitpunkt ist gezeigt. **B**, Darstellung der normierten Fv/Fm-Werte. Alle Fv/Fm-Werte wurden auf den WT-Wert am Zeitpunkt t0 normiert und sind prozentual dargestellt. **C**, Western Blot-Analyse von D1. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt.

Bemerkenswert ist hierbei, dass Linie #44 zwar im ungestressten Zustand WT-ähnliche D1-Mengen aufwies, diese im Verlauf der Starklicht-Exposition aber vergleichbar mit Linie #11 fast vollständig verschwanden.

Die OHP2-OX-Linien verhielten sich grundsätzlich ähnlich wie der WT, d.h. spätestens nach 24 Stunden war eine signifikante Destabilisierung von D1 erkennbar. Interessanterweise wiesen die OHP1-OX-Linien dagegen einen weniger drastischen Effekt auf die D1-Stabilität auf: Nach 24 Stunden war der D1-Gehalt fast unverändert zum Ausgangswert (Linie #2) bzw. immer noch deutlich höher als im WT (Linie #3). Insgesamt kann eine OHP1-Überexpression daher als vorteilhaft für die Stressresistenz gegenüber Starklicht angesehen werden.

3.6 Analyse der Thylakoidmembranstruktur mittels Elektronenmikroskopie in OHP-defizienten Pflanzen

Analysen der *ohp1*- und *ohp2*-Mutanten mittels Elektronenmikroskopie zeigten starke Entwicklungsdefizite in der Chloroplastenenwicklung (BECK *et al.* 2017; MYOUGA *et al.* 2018). Dies deutet darauf hin, dass das Vorhandensein beider OHPs grundsätzlich essentiell für eine funktionale Chloroplastenenwicklung ist. Da in den *ohp*-Mutanten allerdings aufgrund der Stärke des Mutantenphänotyps eine ganze Reihe an sekundären Effekten angenommen werden kann, deren Beitrag zur gestörten Chloroplastenenwicklung nicht abgeschätzt werden kann, wurden die Chloroplastenmorphologien der OHP1-RNAi-Linien sowie von VIGS-OHP1 und VIGS-OHP2 untersucht.

Bei der Analyse von OHP1-RNAi wurden die beiden oben beschriebenen Linien mit starkem Phänotyp (Linie #11 und #16, Abb. 3.8) eingesetzt. Blätter wurden im Licht geerntet (2 Stunden nach Tagesbeginn), direkt fixiert und anschließend nach Färbung mit Osmiumtetroxid und Einbettung für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) eingesetzt. Es zeigte sich, dass beide Linien grundsätzlich funktional erscheinende Chloroplasten besaßen (Abb. 3.14, Panel 02 & 03). In Linie #11 waren charakteristische Schwellungen der Stromathylakoide zu beobachten (Panel 02), während in Linie #16 (in geringerem Ausmaß auch in Linie #11) auffällig zerstückelt erscheinende Stromathylakoide sichtbar waren (Panel 02 & 03).

Der Vergleich der Chloroplastenmorphologie von VIGS-OHP1 mit VIGS-GFP zeigte keine Unterschiede (Abb. 3.14, Panel 04 & 05). In den VIGS-OHP2-Pflanzen dagegen war die Morphologie auffällig verändert (Panel 06): Neben aufgeblähten und einzelnen Stroma-Thylakoiden waren große blockweise Grana-Stapel zu erkennen. Zudem enthielten die Chloroplasten keine oder nur deutlich kleinere Stärkekörnchen, was auf die verringerte Photosyntheseleistung der VIGS-OHP2-Pflanzen zurückzuführen ist. Ebenfalls nahm die Zahl an Plastoglobuli zu und diese waren größer als in den VIGS-GFP und VIGS-OHP1-Pflanzen.

Keine der untersuchten Linien zeigte vergleichbar drastische Effekte wie die entsprechende T-DNA-Insertionslinie. Dies deutet einerseits darauf hin, dass das Vorhandensein der OHPs vor allem in frühen Stadien des Wachstums für eine normale Chloroplastenenentwicklung essentiell ist (im Vergleich zu den VIGS-Linien in welchen das Silencing erst später induziert wird). Da in *ohp1* noch WT-Gehalte von OHP2 enthalten sind (vgl. z. B. Abb 3.16 C), reicht das Vorhandensein von OHP2 offenbar nicht aus, hier die Funktion von OHP1 zu übernehmen. Andererseits scheinen – wie in den OHP1-RNAi-Linien im Vergleich mit *ohp1* zu sehen ist – kleinste Mengen an OHP1 dafür auszureichen, den drastischen Effekt auf die Chloroplastenenentwicklung auszugleichen: Die Expression des OHP1-RNAi-Konstrukts führte nicht zu einem kompletten *Knockout* von *OHP1*, sodass noch Restmengen an OHP1-Protein vorliegen dürften. Trotzdem zeigten die Chloroplasten dieser OHP1-defizienten Linien Anzeichen von Stress, wie z. B. die geschwollenen Stromathylakoide in Linie #11.

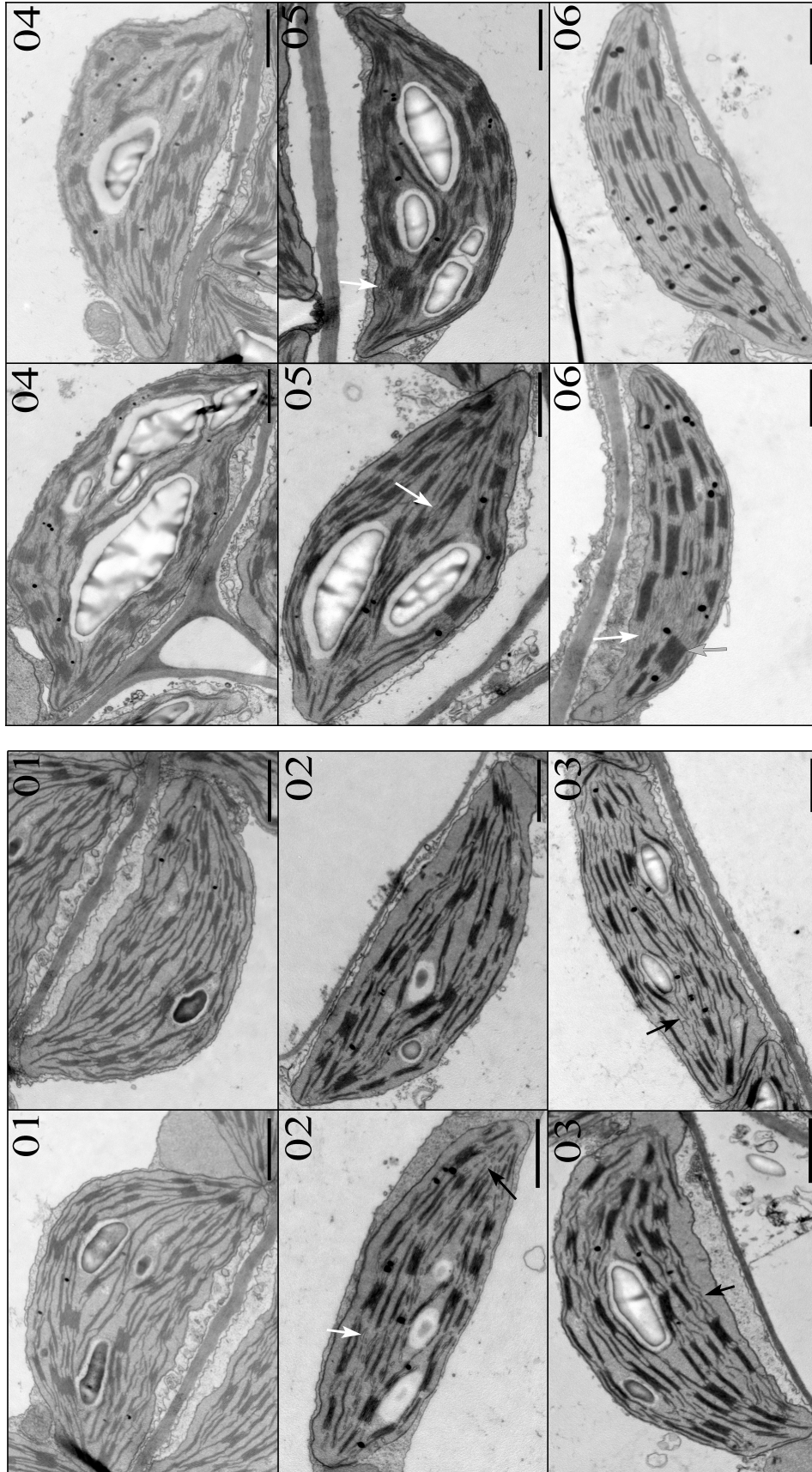


Abbildung 3.14: Analyse der Chloroplastenmorphologie mittels Elektronenmikroskopie in OHP-defizienten Pflanzen. Blätter der entsprechenden Linien wurden im Licht geerntet, direkt fixiert und mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie analysiert. 01, WT Col-0; 02, OHP1-RNAi #11; 03, OHP1-RNAi #16; 04, VIGS-GFP; 05, VIGS-OHP1; 06, VIGS-OHP2. Je zwei repräsentative Schnitte pro Linie sind gezeigt. Die Pfeile markieren die folgenden Beobachtungen: weiß, geschwollene Thylakoide; grau, große Grana-Stapel; schwarz: fragmentierte Stromathylakoide. Der Maßbalken repräsentiert 500nm. Die TEM-Aufnahmen wurden von Prof. Stefan Geimer (Universität Bayreuth) durchgeführt.

3.7 Komplementationsversuche der *ohp*-Mutanten

In der weiteren Funktionsanalyse von OHP1 und OHP2 waren verschiedene Aspekte von besonderem Interesse: Wie oben beschrieben (Abschnitt 3.1.1) wurde eine OHP1-Variante mit mutiertem Cystein 76 (C76A) zur Komplementation der *ohp1*-Mutante verwendet, um eine potentielle Redoxkontrolle von OHP1 zu untersuchen. Der Austausch des Cysteins hatte dabei keinen Einfluss auf die Komplementationsfähigkeit und die Funktion von OHP1 in der *ohp1*-Mutante. Weiterhin bestand die Frage, wie sich eine sequentielle Deletion der verschiedenen Abschnitte des OHP2-Proteins (d.h. der mit ProRS, M und C bezeichneten Abschnitte, vgl. Abb. 1.5) auf die Komplementationsfähigkeit der *ohp2*-Mutante auswirken würde (Abschnitt 3.7.1). Da sowohl OHP1 als auch OHP2 konservierte Aminosäuren im Chl-Bindemotiv mit anderen Vertretern der LHC-Proteinfamilie teilen, war die Verwendung entsprechend mutierter OHP-Varianten (OHP1-AAA bzw. OHP2-AAA) zur Komplementation ebenfalls ein aussichtsreicher Ansatz, um Informationen über die Funktion dieses Motivs in OHP1 und OHP2 zu erlangen (Abschnitt 3.7.2). Abschließend wurde untersucht, ob eine membrangebundene HCF244-Variante zur Komplementation von *ohp2* beitragen konnte (Abschnitt 3.7.3).

3.7.1 Komplementation von *ohp2* mit verkürzten OHP2-Varianten

Wie in HEY *et al.* (2018a) beschrieben liegt die Interaktionsstelle von OHP2 mit HCF244 vermutlich im mittleren Bereich des Proteins (M) zwischen dem N-terminalen Prolin-reichen Abschnitt und der C-terminalen TMH, welche das Chl-Bindemotiv enthält (Abb. 1.5 A). OHP2 ist für die Stabilität von HCF244 unabdingbar (HEY *et al.* 2018a). Es war daher von Interesse, den mittleren Bereich des OHP2-Proteins zu deletieren (Δ M) und die Fähigkeit des verkürzten Proteins zur Komplementation der *ohp2*-Mutante zu analysieren. Vergleichbares Interesse galt der Deletion des Prolin-reichen Abschnitts am N-Terminus (Δ ProRS), der wahrscheinlich für Interaktionen zu weiteren Bindungspartnern nötig ist, obgleich deren Identität unklar ist. Als Negativkontrolle wurde eine OHP2-Variante ohne den die LHC-Helix beinhaltenden C-Terminus mit einbezogen (Δ C), da eine Membranverankerung von OHP2 als zwingend für die membranlokalisierte Interaktion von OHP2 mit OHP1, sowie die Stabilität von OHP2 vermutet wurde. Sämtliche Komplementationskonstrukte bestanden aus der entsprechend modifizierten CDS, eingerahmt in ein 1000bp-Fragment *upstream* des Startcodons, sowie ein 500bp-Fragment nach dem Stopcodon. Die Expression geschah daher unter Kontrolle des endogenen OHP2-Promotors.

3.7.1.1 Phänotyp der OHP2-Deletions-Komplementationslinien

Das Einbringen des OHP2-WT-Konstruktes führte zur vollständigen (makroskopischen) Komplementation des *ohp2*-Phänotyps in den untersuchten Linien (Abb. 3.15 A). Ebenso war das OHP2- Δ ProRS-Konstrukt zur Komplementation in der Lage. Dahingegen zeigten die OHP2- Δ M-Linien nur eine partielle Komplementation mit mittelgroßen aber hellgrünen Pflanzen, wohingegen das OHP2- Δ C-Konstrukt nicht in der Lage war, den *ohp2*-Phänotyp zu komplementieren. Die Pflanzen letzterer Linien mit homozygoter OHP2-T-DNA-Insertion plus Transgen ähnelten phänotypisch

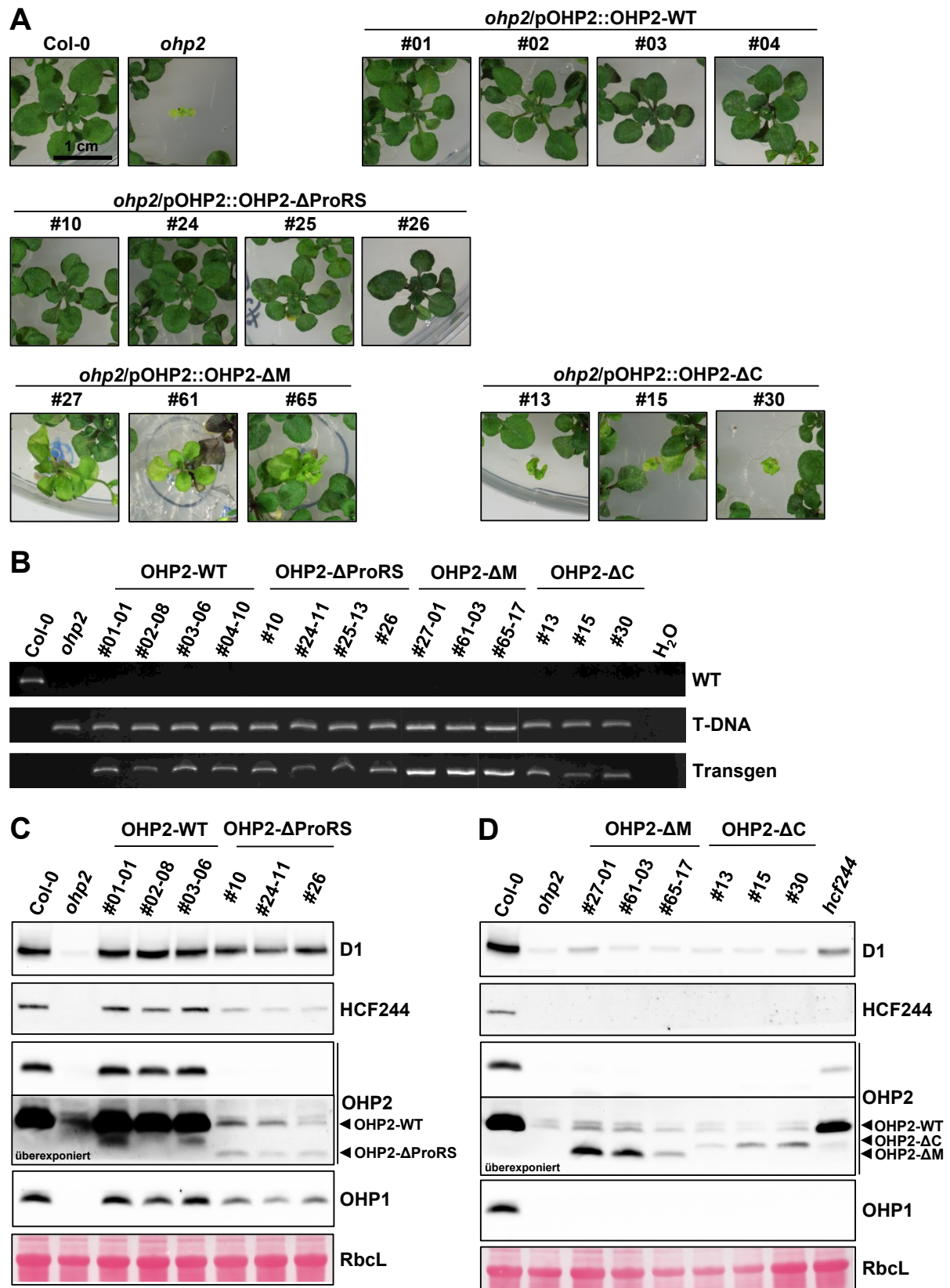


Abbildung 3.15: Komplementation von *ohp2* mit verkürzten OHP2-Varianten. Detaillierte Beschreibung auf der nächsten Seite.

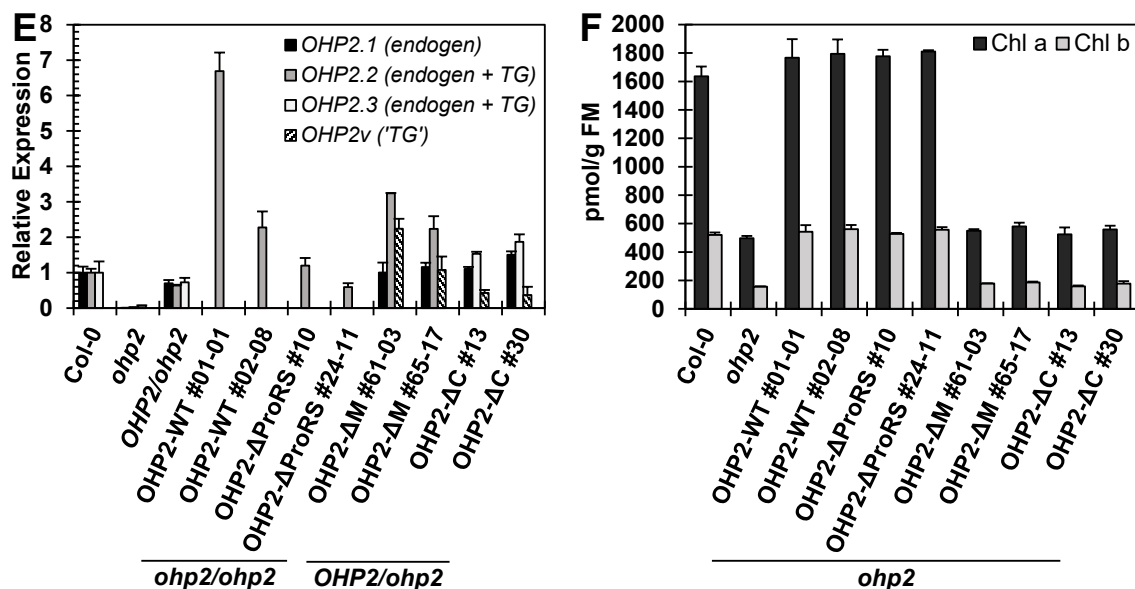


Abbildung 3.15 (Fortsetzung): Komplementation von *ohp2* mit verkürzten OHP2-Varianten. Verschiedene Abschnitte des OHP2-Proteins wurden deletiert (Δ ProRS: Aminosäuren 49-81, Δ M: Aminosäuren 82-129 und Δ C: Aminosäuren 130-172) und die codierenden Sequenzen einschließlich eines ca. 1000bp großen Abschnitts *upstream* des Startcodons und 500bp nach dem Stopcodon in die *ohp2*-Mutante eingebracht. **A**, Phänotyp drei Wochen alter Pflanzen der Komplementationslinien. Die Anzucht erfolgte auf 2% Saccharose enthaltendem $1/2$ -MS-Medium unter Dauerlicht-Bedingungen ($100 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$). **B**, Genotypisierungs-PCR zur Bestätigung der Homozygotie der gezeigten Komplementationslinien. **C/D**, Western Blot-Analyse von jeweils drei der Komplementationslinien (**C**: WT und Δ ProRS, **D**: Δ M und Δ C). Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt. Die Pfeile bezeichnen die verschiedenen verkürzten OHP2-Varianten im (überexponierten) OHP2-Signal. **E**, Quantitative PCR von OHP2 in ausgewählten Linien. Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA für die qRT-PCR eingesetzt. Insgesamt wurden drei verschiedene OHP2-Primerpaare verwendet (OHP2.1-OHP2.3). Da von OHP2- Δ M und Δ C nur ausreichend Pflanzenmaterial mit heterozygotem *ohp2*-Hintergrund (OHP2/*ohp2*) geerntet werden konnte, wurden die Werte der verschiedenen Primerpaare zu einer 'Transgen' (TG)-Expression verrechnet (OHP2v[*virtuell*]). **F**, Analyse der Chl-Gehalte mittels HPLC. Pigmente wurden mit basischem Aceton aus pulverisierten Blattproben extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung geschah im Vergleich mit reinen Standards. FM: Frischmasse.

der *ohp2*-Mutante, waren aber bei gleichem Alter ein wenig stärker entwickelt (Abb. 3.15 A). Die OHP2- Δ C-Pflanzen starben vergleichbar zur *ohp2*-Mutante beim Umsetzen von MS-Medium auf Erde ab, wohingegen die Pflanzen der OHP2- Δ M-Linie das Umsetzen überlebten, Blüten hervorbrachten und Saatgut bildeten. Dieses keimte jedoch nicht aus. Die Homozygotie der untersuchten Linien wurde mittels Genotypisierungs-PCR bestätigt (Abb. 3.15 B).

Die Analyse der Proteingehalte ergab, dass die OHP2-WT-Linien WT-artige Mengen von OHP2 akkumulierten (Abb. 3.15 C). Entsprechend kann das ausgewählte 1000bp-Fragment *upstream* des Startcodons als hinreichend für die OHP2-Promotoraktivität angesehen werden. In den OHP2-WT-Linien erhielten sich ebenfalls die Gehalte an OHP1, HCF244 sowie D1 im Vergleich zu *ohp2*. Im Gegensatz zu OHP2-WT waren in den OHP2- Δ ProRS, Δ M und Δ C-Linien nur stark verringerte Mengen an OHP2 detektierbar (Abb. 3.15 C,D), die nur bei Überexposition (bezogen auf das WT-OHP2-Signal) sichtbar waren. Hierbei muss einschränkend angemerkt werden, dass die Reaktivität des α -OHP2-Antikörpers hinsichtlich der einzelnen Teile des Proteins nicht bekannt war. Insofern war eine absolute Quantifizierung der drei Proteinvarianten in den Komplementationslinien nicht möglich. Die vollständige phänotypische Komplementation der Δ ProRS-Linien spiegelte sich auch im WT-ähnlichen D1-Gehalt wider, wobei von HCF244 und OHP1 nur etwa 50% der WT-Mengen

nachgewiesen wurden (Abb. 3.15 C). Eine Akkumulation von OHP2-ΔProRS von mindestens 50% der WT-Menge kann daher trotz des schwachen Signals angenommen werden. Obwohl die OHP2-ΔM-Linien phänotypisch eine partielle Komplementation zeigten, spiegelte sich dies nicht in den Gehalten der untersuchten Proteine wider: Ein Verlust von HCF244 infolge der Deletion der Interaktionsstelle in OHP2 – und somit auch die Unfähigkeit zur Erholung des D1-Gehalts – war zwar erwartet worden, die Interaktion zu OHP1 sollte allerdings weiterhin möglich sein. Trotzdem wurden keine detektierbaren OHP1-Gehalte beobachtet. Die OHP2-ΔC-Variante sollte ein lösliches Protein ergeben, welches nicht mehr mit OHP1 interagieren kann. Daher war wie erwartet kein OHP1 detektierbar. Grundsätzlich sollte die Interaktion mit HCF244 aber noch möglich sein. Trotzdem konnte kein HCF244 mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.15 D). Der D1-Gehalt änderte sich erwartungsgemäß im Vergleich zur *ohp2*-Mutante nicht.

Um zu bestätigen, dass die niedrigen detektierten OHP2-Mengen nicht auf eine ungenügende Expression der Konstrukte zurückzuführen war, wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Da von den ΔM und ΔC-Linien aufgrund des eingeschränkten Wachstums nur ausreichend Pflanzenmaterial mit heterozygotem *ohp2*-Hintergrund (*OHP2/ohp2*) verfügbar war, wurden für diese Linien mehrere *OHP2*-Primerpaare eingesetzt und anschließend die Transgen-Expression herausgerechnet (*OHP2v[irtuell]*). Die *OHP2*-Expression war in *ohp2* wie erwartet geringer als 1% der WT-Expression, in *OHP2/ohp2* war sie auf 75% verringert (Abb. 3.15 E). Die untersuchten OHP2-WT und ΔProRS-Linien wiesen das 0,8- bis 7-fache der WT-Expression auf (ohne in OHP2-WT #01-01 zu einer erhöhten OHP2-Proteinmenge zu führen, vgl. Abb. 3.15 C); die Verrechnung der Transkriptmengen ergab weiterhin für OHP2-ΔM das 2- bis 1-fache und für OHP2-ΔC noch etwa das 0,5-fache der Expression im WT (Abb. 3.15 E). Insofern kann eine sehr niedrige Expression als Grund für die extrem geringen detektierbaren OHP2-Mengen ausgeschlossen werden. Selbst die nur 0,5-fache Expression von *OHP2* im Vergleich zum WT in OHP2-ΔC erklärt nicht die nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze liegenden Proteinmengen.

Abschließend wurden noch die Chl-Gehalte mittels HPLC bestimmt: Während *ohp2* eine Reduktion auf 30% der WT-Gehalte aufwies, enthielten die untersuchten OHP2-WT und ΔProRS-Linien WT-artige Chl-Mengen (Abb. 3.15 F). Die analysierten ΔM- und ΔC-Linien zeigten dagegen lediglich *ohp2*-ähnliche Chl-Gehalte. Insofern spiegelt sich die partielle makroskopische Komplementation von OHP2-ΔM nicht in einer Erholung des Chl-Gehaltes wider, während für OHP2-ΔC wie erwartet keine erhöhten Chl-Mengen gemessen wurden.

3.7.2 Komplementation von *ohp1* und *ohp2* mit mutierten Chlorophyllbindemotiven

3.7.2.1 Chlorophyllbindemotiv der LHC-Proteinfamilie

Die LHC-Helices aller LHCPs (TMH 1 und 3) und LHC-ähnlicher Proteine, sowie die TMH der cyanobakteriellen Hlips teilen konservierte Aminosäuren (ENGELKEN *et al.* 2010). Der höchste Konservierungsgrad betrifft dabei unter anderem den Beginn der Helix (Sequenzabschnitt ExxNxR), wobei die beiden Aminosäuren zwischen E und N sehr variabel sind, während zwischen N und R in der Regel ein Glycin vorliegt (ENGELKEN *et al.* 2010). Innerhalb der beiden LHC-Helices der LHCPs

gibt es unter anderem einen herausstehenden Unterschied von dieser Sequenz an der Stelle des N, an dessen Position in Helix 1 der meisten LHCP-Vertreter stattdessen ein Histidin vorliegt (ENGELKEN *et al.* 2010). Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die drei o.g., konservierten Aminosäuren für die Chl-Bindung der LHCPs von Bedeutung (vgl. Abb. 1.7, Abschnitt 1.3.4), da in Kristallstrukturanalysen eine direkte Interaktion ihrer Seitenketten mit gebundenen Chl-Molekülen beobachtet werden konnte (LIU *et al.* 2004). Der Austausch dieser drei Aminosäuren war daher der vielversprechendste Ansatz zur Funktionsanalyse der OHPs bezüglich einer potentiellen Pigmentbindung mittels der Aminosäureseitengruppen. Zur Komplementation wurden die *ohp1*- und *ohp2*-Mutanten mit einem Wildtyp-Konstrukt (WT) bzw. mutierten cDNA-Sequenzen (AAA) zur Expression (der entsprechend modifizierten CDS) unter Kontrolle des 35S-Promotors transformiert.

3.7.2.2 Phänotyp der OHP1-AAA-Linien

Die Positionen der konservierten Aminosäuren Glutamat, Asparagin und Arginin in der Aminosäuresequenz von OHP1 sind 69, 72 und 74. Diese Aminosäuren wurden gegen Alanin ausgetauscht. Während das Einbringen des WT-Konstruktes den starken makroskopischen Phänotyp der *ohp1*-Mutante revertieren konnte, ähnelten die Pflanzen der OHP1-AAA-Linien der *ohp1*-Mutante (Abb. 3.16 A). Dies konnte für mehrere unabhängige Linien bestätigt werden. Wie beschrieben führt das Fehlen von OHP1 zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums sowie dem Verlust der Photoautotrophie. Homozygote *ohp1*-Pflanzen sind nur bei externer Versorgung mit Saccharose lebensfähig und sterben bei der Aussaat auf Erde nach der Keimung ab (ebenso wie auf MS-Medium angezogene Pflanzen nach dem Überführen auf Erde). Dieses Wachstumsverhalten lag auch bei den OHP1-AAA-Pflanzen vor. Die Analysen wurden daher mit Pflanzen durchgeführt, die auf 2% Saccharose enthaltendem 1/2-MS-Medium angezogen wurden. Bei der Weiterkultivierung auf diesem Medium gelangten auch die OHP1-AAA-Pflanzen zur Blüte und setzten Samen an, diese keimten allerdings ebenfalls nicht aus.

Die Homozygotie hinsichtlich der T-DNA-Insertion im *OHP1*-Gen sowie das Vorhandensein des Transgens wurden mittels Genotypisierungs-PCR bestätigt (Abb. 3.16 B). Die Analysen der OHP1- und OHP2-Proteingehalte durch SDS-PAGE und Western Blot zeigten, dass die untersuchten OHP1-WT-Linien annähernd WT-artige Mengen an OHP1 akkumulierten (Abb. 3.16 C). Die OHP1-AAA-Linien wiesen demgegenüber sogar bis zur 5-fachen Menge an OHP1 auf. In beiden Fällen war der Gehalt an OHP2 jedoch quasi WT-artig, was ebenfalls für die *ohp1*-Mutante zutraf. Interessanterweise war ausschließlich in den OHP1-AAA-Linien eine zusätzliche OHP2-Bande größeren Molekulargewichts detektierbar. Diese repräsentiert wahrscheinlich unprozessiertes OHP2-Protein (d.h. mit noch anhängendem Transitpeptid). Wie in der Literatur beschrieben war die Menge an D1-Protein in *ohp1* stark reduziert (BECK *et al.* 2017), und dies konnte – mit dem makroskopischen Phänotyp korrelierend – nicht durch Expression des OHP1-AAA-Konstruktes komplementiert werden (Abb. 3.16 C). Die OHP1-WT-Linien dagegen enthielten WT-artige Mengen an D1-Protein.

Da in den VIGS-OHP1-Linien der Verlust an OHP1-Protein zu einer Reduktion von HCF244 führte, wurde dessen Proteingehalt ebenfalls in den Komplementationslinien bestimmt. Es zeigte sich, dass HCF244 in der *ohp1*-Mutante wie in VIGS-OHP1 deutlich verringert war, bei Expression

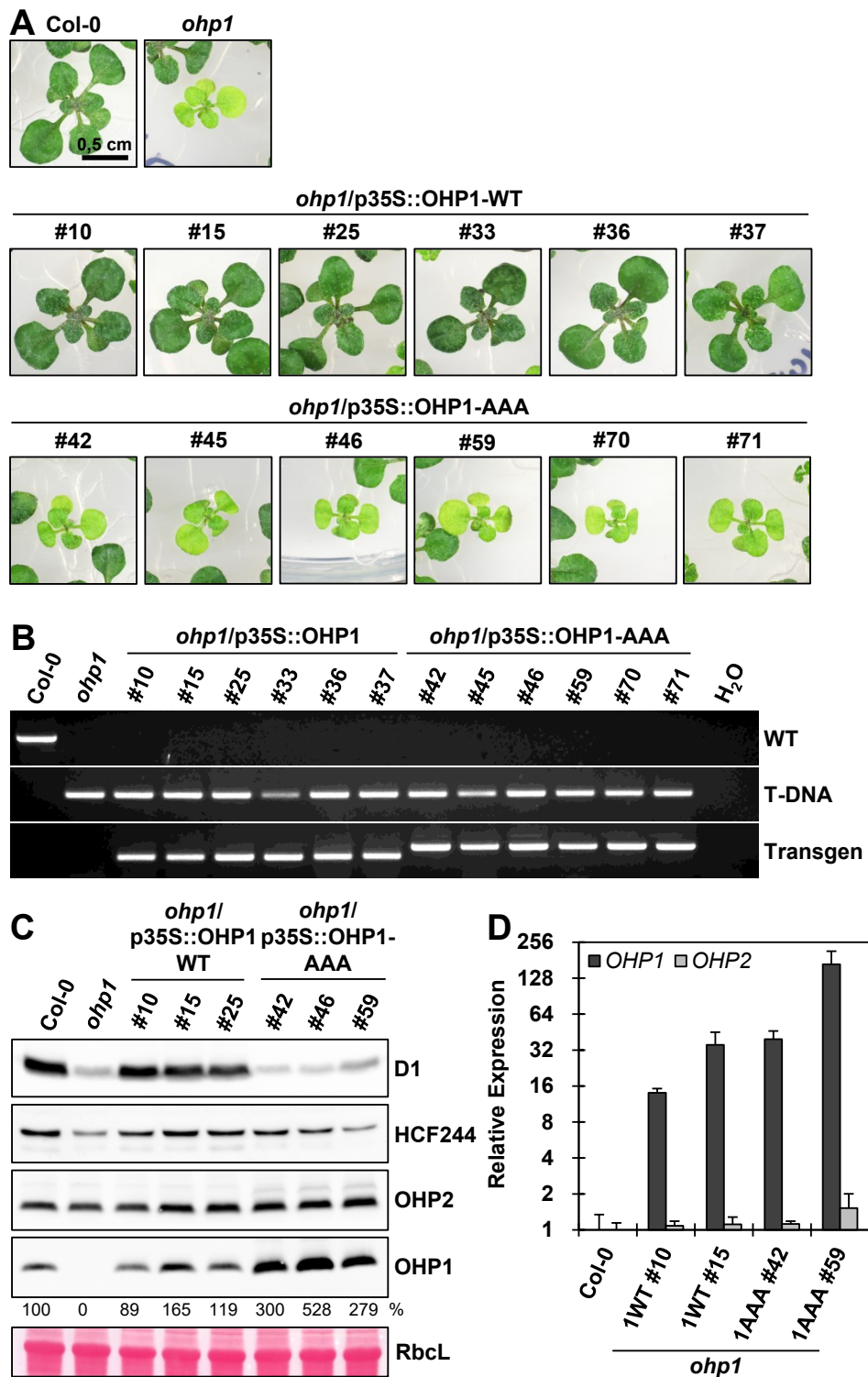


Abbildung 3.16: Komplementation von *ohp1* mit einer Chlorophyllbindemotivmutante. Die *ohp1*-Mutante wurde mit einem Wildtyp-Konstrukt (WT) sowie einer OHP1-Variante mit drei Aminosäure-Austauschen zu Alanin im Chl-Bindemotiv (AAA) komplementiert. Die mutierten Aminosäuren waren Glutamat 69, Asparagin 72 und Arginin 74. Die Expression der mutierten cDNA-Sequenz erfolgte unter Kontrolle des 35S-Promotors. **A**, Phänotyp der untersuchten Linien. Die Anzucht erfolgte für 3 Wochen auf 2% Saccharose enthaltendem 1/2-MS-Medium unter Dauerlicht-Bedingungen ($100 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$). **B**, Genotypisierungs-PCR zur Bestätigung der Homozygotie der untersuchten Komplementationslinien. **C**, Western Blot-Analyse von jeweils drei ausgesuchten Komplementationslinien. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Die Zahlen unterhalb des OHP1-Signals geben die densitometrisch bestimmten Signalintensitäten wieder. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt. **D**, Quantitative PCR der *OHP*-Gene in jeweils zwei ausgesuchten Komplementationslinien. Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA für die qRT-PCR eingesetzt.

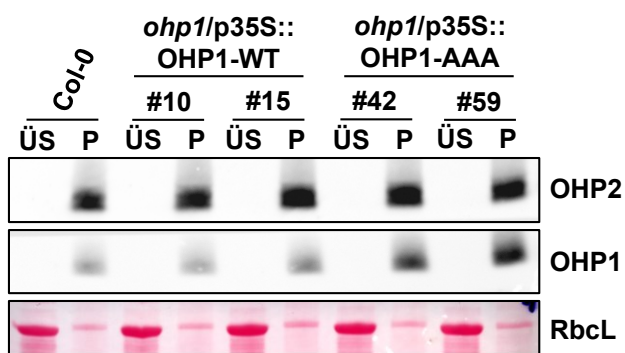


Abbildung 3.17: Untersuchung der Membranassoziation der OHP1-AAA-Variante. Native Fraktionierung von Gesamtproteinextrakten in eine lösliche und membran-gebundene Fraktion. Pulverisiertes Blattmaterial wurde in PBS-Puffer aufgenommen und die löslichen Proteine (Überstand, ÜS) von den membrangebundenen (Pellet, P) durch Zentrifugation getrennt. Die Proteine wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und per Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle ist die lösliche große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt. Die Bande mit etwas höherem Molekulargewicht in den Pellet-Fractionen stammt von einem anderen, membrangebundenen Protein.

des WT-OHP1-Konstruktes aber wieder WT-Mengen akkumulierten (Abb. 3.16 C). In den OHP1-AAA-Linien war etwas weniger HCF244 als im WT detektierbar, die Gehalte übertrafen aber in der Regel die in der *ohp1*-Mutante nachweisbaren Mengen. Ein Beitrag des verringerten HCF244-Proteins zur mangelnden Komplementationsfähigkeit des OHP1-AAA-Konstrukts kann daher als unwahrscheinlich angesehen werden.

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Mengen an OHP1 in den verschiedenen Linien durch unterschiedliche Expressionslevel der *OHP1*-mRNA hervorgerufen wurden, wurde für ausgewählte Linien die relative *OHP1*-Expression im Vergleich zum WT bestimmt. Es zeigte sich, dass die Linie OHP1-AAA #42 ein ähnliches Expressionslevel von *OHP1* wie die Linie OHP1-WT #15 aufwies (Abb. 3.16 D), aber trotzdem das 3-fache an Protein im Vergleich zum WT akkumulierte. Die Linie OHP1-AAA #59, in welcher eine mehr als 150-fache Anreicherung von *OHP1* detektiert wurde, wies trotzdem nur eine moderat erhöhte OHP1-Proteinmenge auf. Die *OHP2*-Expression in den verschiedenen Linien war im Wesentlichen unverändert.

3.7.2.3 Interaktion von OHP1-AAA mit OHP2

Beide OHPs interagieren vermutlich innerhalb der Thylakoidmembran mit ihren Transmembranhelices miteinander, was eine räumliche Nähe der Chl-Bindemotive beider Proteine wahrscheinlich macht. Die mangelnde Komplementationsfähigkeit des OHP1-AAA-Proteins führte daher zunächst zur Frage, ob die OHP1-AAA-Variante immer noch membrangebunden vorlag, oder ob eventuell die Mutation in der TMH die Insertion in die Thylakoidmembran beeinträchtigte. Um dies zu untersuchen, wurden Gesamtproteine aus Blattmaterial in eine lösliche und eine Membranfraktion getrennt und die Verteilung von OHP1 und OHP2 analysiert. In allen untersuchten Linien waren die OHP-Proteine wie im WT ausschließlich in der Membranfraktion nachweisbar (Abb. 3.17). Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob eine Beeinträchtigung der Interaktion von OHP1-AAA mit OHP2 für den Phänotyp mit verantwortlich sein könnte. Um zu überprüfen, ob das mutierte OHP1-AAA-Protein noch zur Interaktion mit OHP2 in der Lage war, wurden OHP1-WT und OHP1-AAA als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert und für einen *in vitro*-Pull-down-Assay eingesetzt (Abb. 3.18 A). Dabei zeigte sich, dass sowohl OHP1-WT als auch OHP1-AAA befähigt waren, OHP2 aus Dodecylmaltosid (DDM)-solubilisierten WT-Thylakoiden zu präzipitieren. Von einer positiven Interaktion von OHP1-AAA mit OHP2 kann daher ausgegangen werden.

3.7.2.4 Stabilität der OHP1-AAA-Variante

Auffallend in den OHP1-AAA-Linien war die vergleichsweise hohe Akkumulation an OHP1-Protein, welche in den OHP1-WT-Komplementationslinien sowie in den OHP1-OX-Linien (vgl. Abb. 3.10) trotz ähnlicher *OHP1*-Expressionslevel nicht auftrat: Bei Überexpression von *OHP1* konnte in keinem Fall eine so starke Überakkumulation des OHP1-Proteins beobachtet werden, wie es bei den OHP1-AAA-Linien der Fall war. Im Normalfall ist OHP1 in Abwesenheit von OHP2 nicht stabil (HEY *et al.* 2018a), und zusätzliches OHP1 sollte für seine Stabilisierung ebenfalls auf die Bindung zu OHP2 angewiesen sein. Es stellte sich daher die Frage, ob der etwaige Überschuss an OHP1-AAA ungebunden von OHP2 vorlag, und somit (wenigstens partiell) in Abwesenheit von diesem stabilisiert werden konnte. Daher wurden die Komplementationslinien mit dem VIGS-OHP2-Konstrukt infiltriert und die Proteinlevel von OHP1 und OHP2 analysiert: Während in den OHP1-WT-Linien wie im WT das gesamte OHP1 als Folge des Silencings von *OHP2* verschwand, war in den mit VIGS-OHP2 infiltrierten Pflanzen der OHP1-AAA-Linien immer noch OHP1 detektierbar (Abb. 3.18 B). Die Mengen entsprachen sogar annähernd dem WT-OHP1-Level. Hierbei muss beachtet werden, dass für den VIGS-Assay eine Anzucht auf Erde nötig war und daher mit (für die T-DNA) heterozygoten OHP1-AAA-Pflanzen gearbeitet werden musste. Es kann also nicht mit letzter Sicherheit bestätigt werden, dass das verbleibende Protein tatsächlich die OHP1-AAA-Variante repräsentiert. Aufgrund der zuverlässig in VIGS-OHP2 beobachteten Destabilisierung von WT-OHP1 kann dies aber als wahrscheinlich angenommen werden.

In DDM-solubilisierten Thylakoiden wurden drei OHP1-OHP2-Komplexe verschiedener Größe bei der Auftrennung mittels BN-PAGE beobachtet (HEY *et al.* 2018a). In diesem Zusammenhang war von Interesse, in welchem dieser Komplexe sich das OHP1-AAA-Protein aufhalten würde, da die Interaktion von OHP1-AAA mit OHP2 wie oben beschrieben bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 3.18 A). Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, welche Mobilität das ohne OHP2 vorliegende OHP1-AAA-Protein in VIGS-OHP2-Pflanzen aufweisen würde. Thylakoidmembranen aus den oben beschriebenen Linien wurden solubilisiert und per BN-PAGE und 2D-SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, sowie die OHP-Proteine per Western Blot detektiert. Es zeigte sich, dass das generelle Laufverhalten der OHP-Proteine im BN-Gel den in HEY *et al.* (2018a) beschriebenen drei Komplexen entsprach, d.h. sie auf Höhe des PSII-Monomers (PSIIm), des LHCII-Dimers (LHCII_d) sowie im freien Protein-Bereich (f.P.) migrierten (Abb. 3.18 C). In der untersuchten OHP1-AAA-Linie war keine Zunahme von OHP1-Protein in den beiden Komplexen mit höherem Molekulargewicht zu erkennen. Stattdessen akkumulierte OHP1-Protein stark im unteren Bereich des Gels (f.P.), in welchem monomere bzw. durch die Solubilisierung aus Komplexen herausgelöste Proteine migrieren. Ausschließlich in diesem Bereich war auch OHP1-Protein in den VIGS-OHP2-infiltrierten OHP1-AAA-Linien detektierbar. Da OHP1 im WT beim Silencing von *OHP2* vollständig verschwindet (HEY *et al.* 2018a), repräsentiert dieses Signal OHP1-AAA-Protein, welches offenbar in Abwesenheit von OHP2 nicht Teil von Komplexen ist, sondern als freies Protein vorliegt. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, dass nicht OHP1, sondern OHP2 für die Kopplung des OHP1-OHP2-HCF244-Heterotrimer an andere Komplexe zuständig ist (HEY *et al.* 2018a).

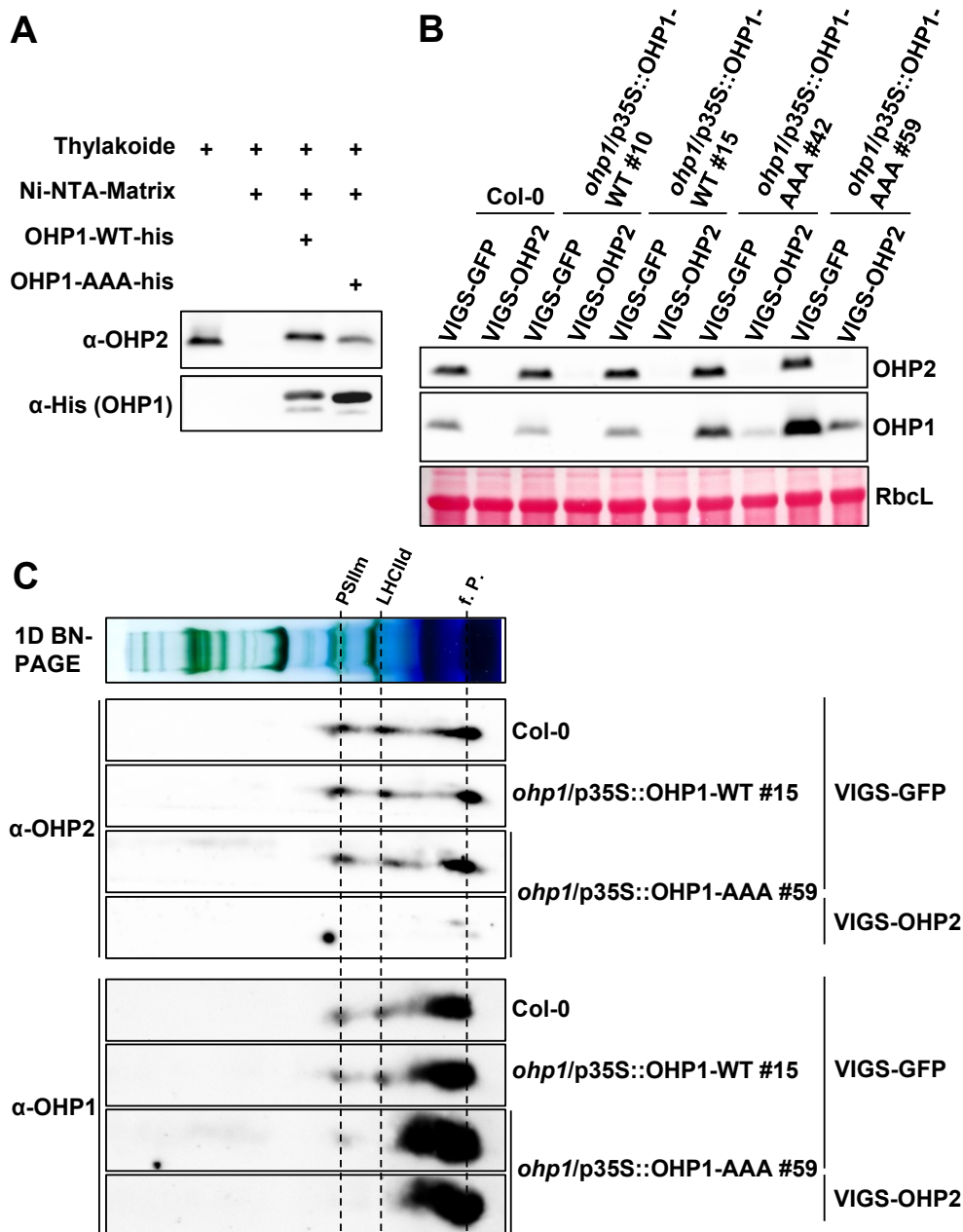


Abbildung 3.18: Analyse der Stabilität des OHP1-AAA-Proteins und der Interaktion von OHP1-AAA mit OHP2. **A**, His-Tag-Pulldown zur Überprüfung der Interaktion von OHP1-AAA mit OHP2 mittels rekombinant exprimierter OHP1-WT und OHP1-AAA-Proteine. 100µg rekombinantes Protein wurde an 50µl Ni-NTA-Matrix gebunden und anschließend mit solubilisierten Thylakoiden inkubiert (100µg Chl, solubilisiert mit 0,5% DDM). Nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit 250mM Imidazol eluiert und elektrophoretisch aufgetrennt. **B**, VIGS-Assay in den OHP1-Komplementationslinien. Die Linien wurden hierzu unter Langtag-Bedingungen angezogen (16h Licht, 100 µmol Photonen s⁻¹ m⁻²) und der VIGS-Assay wie in HEY *et al.* (2018a) beschrieben durchgeführt. Da die für die OHP1-T-DNA homozygoten OHP1-AAA-Pflanzen wie die *ohp1*-Mutante nicht auf Erde angezogen werden konnte, wurden heterozygote OHP1-AAA-Pflanzen für die Analyse verwendet. OHP2 wurde per VIGS inaktiviert und Gesamtproteinextrakte mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die OHP1- und OHP2-Proteingehalte getestet. **C**, BN-PAGE-Analyse des OHP1-OHP2-Komplexes in den OHP1-Komplementationslinien. Thylakoidmembranen aus den VIGS-Pflanzen (10µg Chl) wurden mit 1% DDM solubilisiert und auf einem BN-Gel aufgetrennt. Nach Denaturierung der 1. Dimension erfolgte eine Auftrennung per SDS-PAGE in der zweiten Dimension und Western Blot. PSII_m: PSII-Monomer, LHCII_d: LHCII-Dimer, f.P.: freies Protein.

Die offenbar höhere Stabilität des OHP1-AAA-Proteins gegenüber dem WT-OHP1-Protein sowie der unvollständige Abbau in Abwesenheit von OHP2 (VIGS-OHP2) lässt sich vermutlich nicht durch die Expression unter Kontrolle des 35S-Promotors und damit dem stark erhöhten *OHP1*-Transkriptgehalt erklären: In OHP1-WT-Linien wurde eine ähnlich starke *OHP1*-Expression und trotzdem nur WT-OHP1-Gehalte beobachtet. Eine Erklärung für die Stabilität von OHP1-AAA ist, dass die Protease, welche für den Abbau von OHP1 (z. B. in Abwesenheit von OHP2), sowie möglicherweise auch den Abbau anderer Proteine der LHC-Familie verantwortlich ist, das intakte Chl-Bindemotiv (insbesondere die konservierten Aminosäuren) als Erkennungsstelle benötigt. Alternativ wäre denkbar, dass OHP1 während seiner Funktionsausübung z. B. über gebundene Pigmente photooxidativ geschädigt wird (vergleichbar mit D1) und kontinuierlich abgebaut bzw. neu synthetisiert wird. Wenn die AAA-Variante aufgrund fehlender Pigmentbindung (vgl. Abschnitt 3.8) entsprechend nicht geschädigt und somit nicht abgebaut würde, könnte dies eine Akkumulation des Proteins erklären.

3.7.2.5 Phänotyp der OHP2-AAA-Linien

Wie bei den OHP1-AAA-Linien wurden in den OHP2-AAA-Linien die gleichen konservierten Aminosäuren des Chl-Bindemotivs zu Alanin mutiert. Diese entsprechen bei OHP2 Glutamat 130, Asparagin 133 und Arginin 135. Während das Einbringen des WT-Konstruktes den drastischen makroskopischen Phänotyp der *ohp2*-Mutante revertieren konnte, traf dies auf das OHP2-AAA-Konstrukt nur partiell zu: Pflanzen der Linien #39 und #44 mit homozygotem *ohp2*-Hintergrund (und WT-artigem OHP2-Gehalt) waren zwar deutlich größer als die *ohp2*-Mutante, aber trotzdem noch deutlich wachstumsverzögert und schwächer pigmentiert als der WT (Abb. 3.19 A). Die Homozygotie hinsichtlich der T-DNA-Insertion im *OHP2*-Gen wurde mittels Genotypisierungs-PCR für alle Linien bestätigt (Abb. 3.19 B). Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass die OHP2-AAA-Linien #39 und #44 (sowie die OHP2-WT-Linien) in etwa WT-Gehalte von OHP2 akkumulierten (Abb. 3.19 C). Mit dem WT-artigen Gehalt an OHP2-AAA ging auch ein leicht gegenüber *ohp2* erhöhter Gehalt an D1 einher. Der HCF244-Gehalt in den OHP2-AAA-Linien erhöhte sich ebenfalls im Vergleich zu *ohp2*, auch wenn nicht ganz WT-ähnliche Mengen erreicht wurden. Zusammenfassend kann bei den OHP2-AAA-Linien von einer partiellen Komplementation des *ohp2*-Phänotyps gesprochen werden.

3.7.2.6 Interaktion von OHP2-AAA mit OHP1 und HCF244

Wie bei OHP1-AAA bestand auch für die OHP2-AAA-Variante die Frage, ob eine Interaktion mit OHP1 durch die Aminosäureaustausche in der für die Interaktion verantwortlichen TMH noch möglich war. Um dies zu verifizieren, wurden wie oben OHP2-WT und OHP2-AAA als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert und für einen *in vitro*-Pulldown-Assay eingesetzt (Abb. 3.20 A). Es ergab sich, dass sowohl OHP2-WT als auch OHP2-AAA in der Lage waren, OHP1 aus DDM-solubilisierten WT-Thylakoiden zu präzipitieren. Von einer positiven Interaktion von OHP2-AAA mit OHP1 kann daher ausgegangen werden.

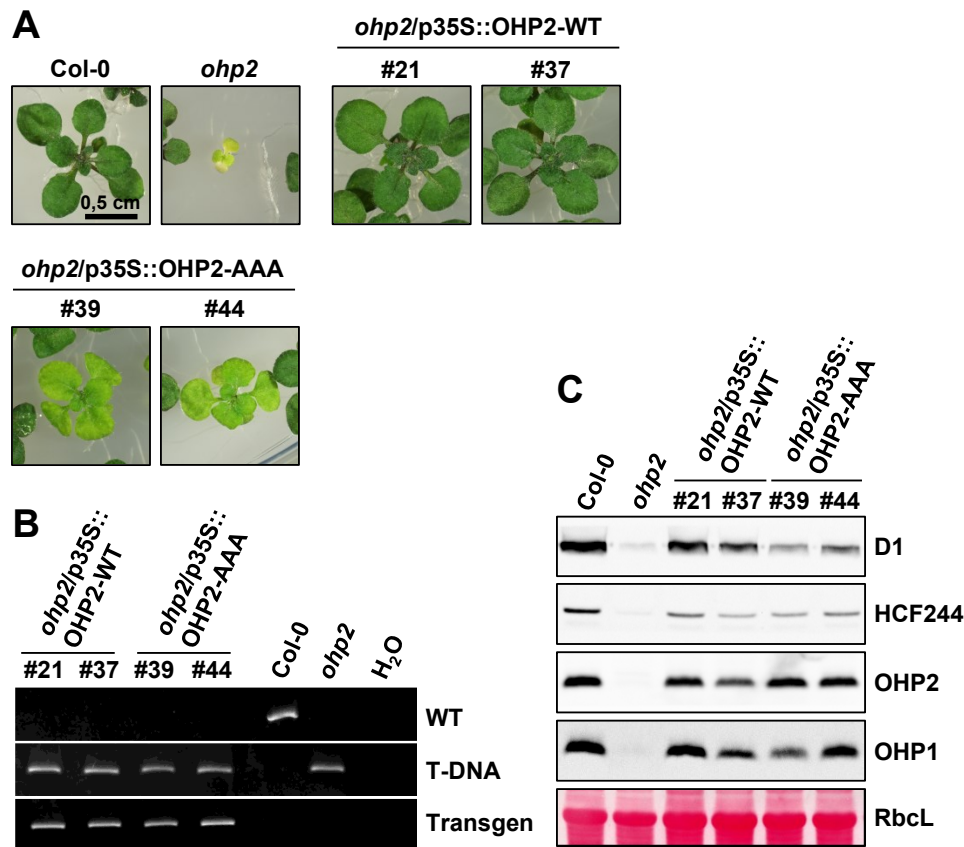


Abbildung 3.19: Komplementation von *ohp2* mit einer Chlorophyllbindemotivmutante. Die *ohp2*-Mutante wurde mit einem Wildtyp-Konstrukt (WT) sowie einer OHP2-Variante mit drei Aminosäure-Austauschen zu Alanin im Chl-Bindemotiv (AAA) komplementiert. Die mutierten Aminosäuren waren Glutamat 130, Asparagin 133 und Arginin 135. Die Expression der mutierten cDNA-Sequenz erfolgte unter Kontrolle des 35S-Promotors. **A**, Phänotyp der untersuchten Linien. Die Anzucht erfolgte für 3 Wochen auf 2% Saccharose enthaltendem 1/2-MS-Medium unter Dauerlicht-Bedingungen (100 $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$). **B**, Genotypisierungs-PCR zur Bestätigung der Homozygotie der untersuchten Komplementationslinien. **C**, Western Blot-Analyse der Komplementationslinien. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt.

Die Interaktion von HCF244 mit OHP2-AAA konnte mit diesem experimentellen Ansatz nicht eindeutig bestätigt werden, da HCF244 auch in der Negativkontrolle (Ni-NTA-Matrix ohne Köder-Protein) an das Säulenmaterial band (Daten nicht gezeigt). Daher wurde zur Untersuchung der Interaktion ein BiFC-Experiment durchgeführt, mit welchem bereits die Lokalisierung der Interaktionsstelle innerhalb OHP2 gegenüber HCF244 gezeigt werden konnte (HEY *et al.* 2018a). Die Expression von OHP2-AAA zusammen mit HCF244 als splitYFP-Fusionsproteine in *N. benthamiana*-Blättern führte wie in der Kontrolle (OHP2-WT mit HCF244) zu detektierbarer YFP-Fluoreszenz im Chloroplasten. Daher kann die Interaktion von HCF244 mit der OHP2-AAA-Variante als bestätigt angesehen werden.

3.7.3 Komplementation von *ohp2* mit einer membrangebundenen HCF244-Variante

OHP2 ist wesentlich für die Stabilität von HCF244 (HEY *et al.* 2018a), vermutlich indem es HCF244 an die Thylakoidmembran bindet und dadurch stabilisiert bzw. vor Proteasen schützt (LINK *et al.* 2012; HEY *et al.* 2018a). Das Vorhandensein von sowohl OHP2 als auch HCF244 wiederum ist

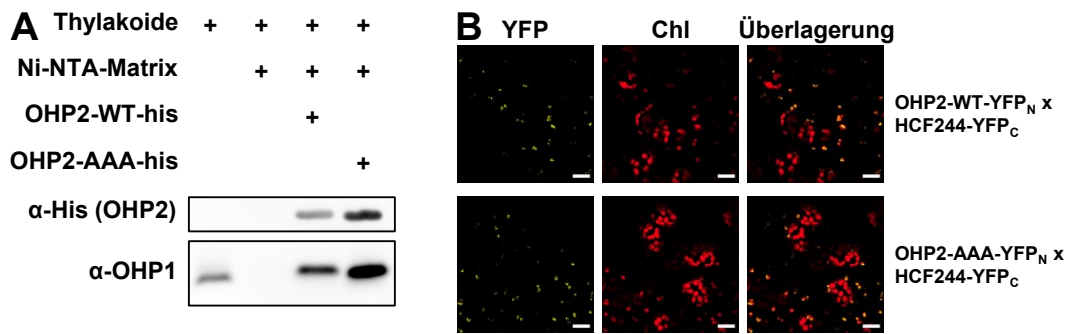


Abbildung 3.20: Interaktion von OHP2-AAA mit OHP1 und HCF244. A, His-Tag-Pulldown zur Überprüfung der Interaktion von OHP2-AAA mit OHP1 mittels rekombinant exprimierter OHP2-WT und OHP2-AAA-Proteine. 100µg rekombinantes Protein wurde an 50µl Ni-NTA-Matrix gebunden und anschließend mit solubilisierten Thylakoiden inkubiert (100µg Chl, solubilisiert mit 0,5% DDM). Nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit 250mM Imidazol eluiert und elektrophoretisch aufgetrennt. B, BiFC-Experiment zur Untersuchung der Interaktion von OHP2-AAA mit HCF244. Beide Proteine wurden als Fusionsproteine mit den N- und C-terminalen splitYFP-Hälften (YFP_N bzw. YFP_C) in *Nicotiana benthamiana*-Blättern exprimiert und die Fluoreszenz mit einem LSM800-Konfokalmikroskop (Zeiss) analysiert. Die inverse Kombination führte zum gleichen Ergebnis. Der Maßbalken entspricht 20µm.

Bedingung für eine effektive OHP1-Stabilisierung, wie die Analysen der *hcf244*-Mutante bzw. der *hcf244*/OHP2-OX-Linien zeigten (vgl. Abb. 3.11 C). Durch die wechselseitige Stabilisierung wird die spezifische Funktionsbeschreibung von OHP1 und OHP2 gegenüber der Funktion von HCF244 erschwert. Die OHP2-vermittelte Membranverankerung und dadurch Stabilisierung von HCF244 warf daher die Frage auf, ob eine membrangebundene HCF244-Variante möglicherweise in Abwesenheit der OHPs, d.h. in der *ohp2*-Mutante stabil sein könnte. Falls eine membrangebundene HCF244-Variante zur Wiederherstellung der HCF244-Funktionalität führen würde, könnte dies eventuell für eine (mindestens partielle) Komplementation von *ohp2* ausreichen.

3.7.3.1 Phänotyp der *ohp2*/HCF244-TMH_{tAPX}-Linien

HCF244 wurde am C-Terminus mit der TMH der thylakoidgebundenen Ascorbatperoxidase (tAPX, At1g77490, bp 1105-1278 der CDS) fusioniert und das Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des 35S-Promotors im *ohp2*-Hintergrund exprimiert. Die phänotypische Analyse von zwei unabhängigen Linien (*ohp2*/HCF244-TMH_{tAPX} #03 und #05) zeigte, dass Pflanzen mit homozygotem *ohp2*-Hintergrund in Bezug auf ihr gedrungenes Wachstum und die Pigmentierung der *ohp2*-Mutante ähnelten, obgleich sie bei gleichem Alter signifikant weiter entwickelt waren (Abb. 3.21 A). Die Homozygotie der untersuchten Linien wurde mittels Genotypisierungs-PCR bestätigt (Abb. 3.21 B).

Bei der Untersuchung der Proteinlevel konnte eine Akkumulation des HCF244-Fusionsproteins in den HCF244-TMH_{tAPX}-Komplementationslinien beobachtet werden, auch wenn nicht das WT-HCF244-Level (bzw. das Level in den OHP2-WT-Linien) erreicht wurde (Abb. 3.21 C). Grundsätzlich scheint eine Membranverankerung von HCF244 die Stabilität des Proteins auch in Abwesenheit von OHP2 (sowie OHP1) zu ermöglichen. Es ist aber zu beachten, dass Pflanzen der Komplementationslinien mit heterozygotem *ohp2*-Hintergrund eine Überakkumulation des Fusionsproteins im Vergleich zum WT-HCF244-Gehalt aufwiesen (nicht gezeigt), und die Stabilität von HCF244-TMH_{tAPX} daher in gewissem Grad doch mit dem Vorliegen von OHP2 zusammenhängt.

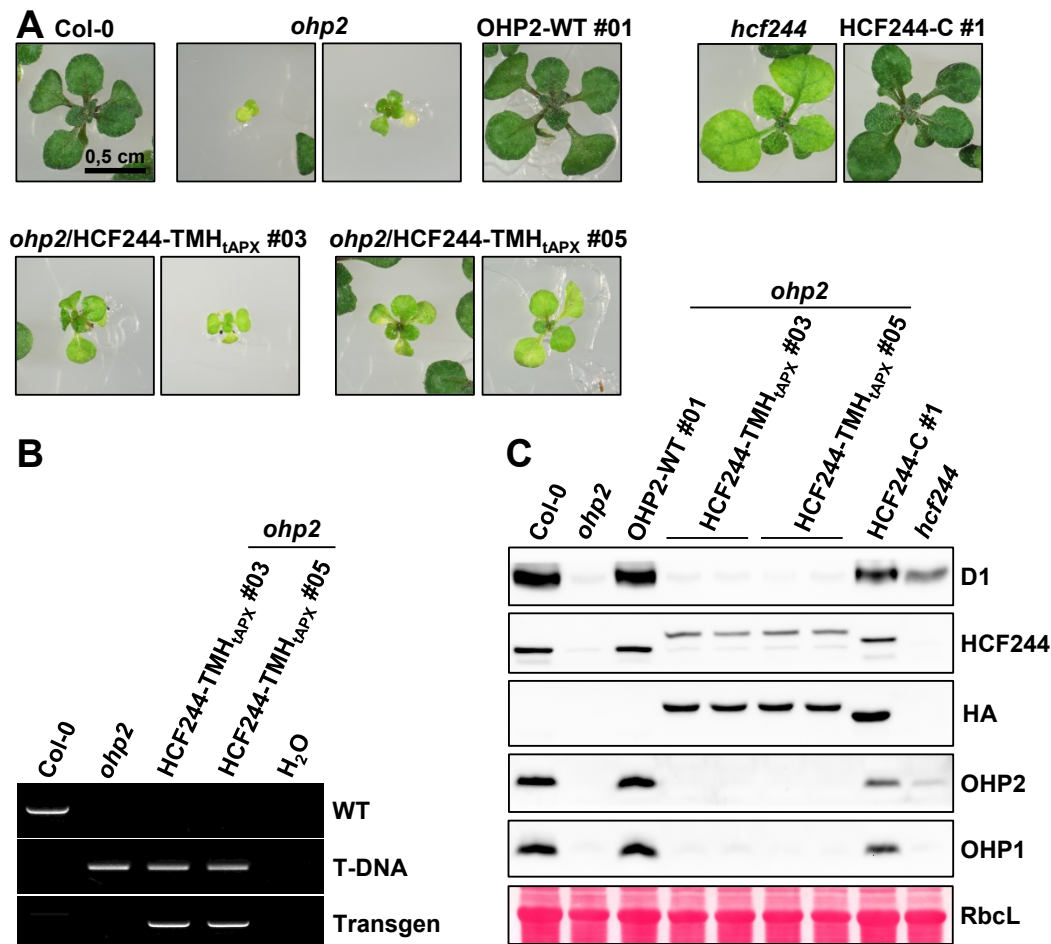


Abbildung 3.21: Komplementation von *ohp2* mit einer membrangebundenen HCF244-Variante. HCF244 wurde C-terminal mit der Transmemhelix der tAPX fusioniert und unter Kontrolle des 35S-Promotors in der *ohp2*-Mutante exprimiert. **A**, Phänotyp der untersuchten Linien. Die Anzucht erfolgte für 3 Wochen auf 2% Saccharose enthaltendem 1/2-MS-Medium unter Dauerlicht-Bedingungen ($100 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$). **B**, Genotypisierungs-PCR zur Bestätigung der Homozygotie der untersuchten Komplementationslinien. **C**, Western Blot-Analyse der Komplementationslinien. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt. Zwei unabhängige Proteinproben für beide HCF244-TMH_{tAPX}-Komplementationslinien wurden geladen.

Der D1-Gehalt in den Komplementationslinien erhöhte sich im Vergleich zu *ohp2* nicht (Abb. 3.21 C). Dass trotz der deutlichen Anreicherung von HCF244 im Vergleich zu *ohp2* nicht einmal eine partielle Komplementation erreicht werden konnte, deutet darauf hin, dass die HCF244-Funktion in Abwesenheit der OHPs nicht für die Wiederherstellung der D1-Synthese ausreicht. Trotzdem sollte die partielle Komplementation auf Ebene des makroskopischen Phänotyps nicht unerwähnt bleiben. Die partielle phänotypische Komplementation könnte in einem stabilisierenden Einfluss des HCF244-Proteins auf andere Proteine begründet sein.

3.7.3.2 Phänotyp der *hcf244*/HCF244-TMH_{tAPX}-Linien

Um auszuschließen, dass die fehlende Komplementationsfähigkeit des HCF244-TMH_{tAPX}-Konstruktes auf eine Inaktivität des Fusionsproteins zurückzuführen war, wurde ebenfalls die *hcf244*-Mutante mit dem HCF244-TMH_{tAPX}-Konstrukt transformiert. Die phänotypische Analyse von

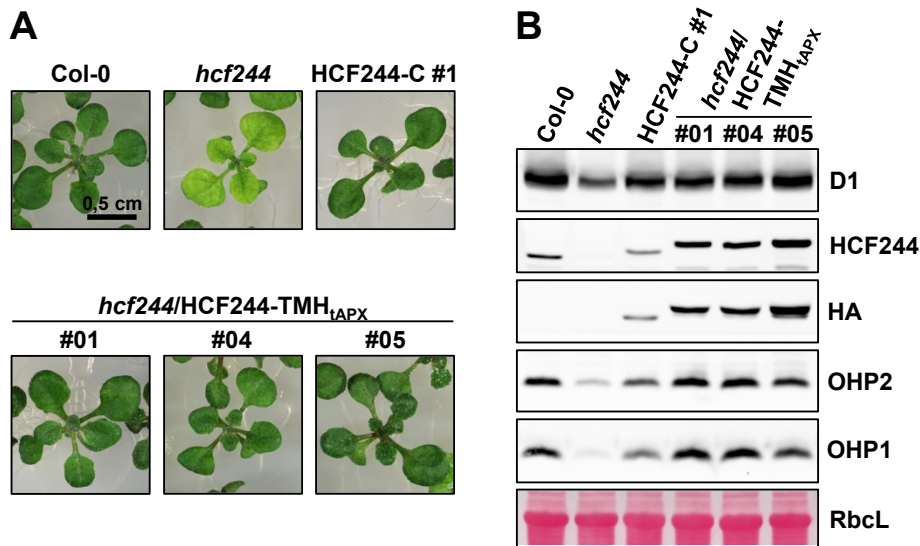


Abbildung 3.22: Komplementation von *hcf244* mit einer membrangebundenen HCF244-Variante. HCF244 wurde C-terminal mit der Transmemhelix der *tAPX* fusioniert und unter Kontrolle des 35S-Promotors in der *hcf244*-Mutante exprimiert. **A**, Phänotyp der untersuchten Linien. Die Anzucht erfolgte für 3 Wochen auf 2% Saccharose enthaltendem 1/2-MS-Medium unter Dauerlicht-Bedingungen ($100 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$). **B**, Western Blot-Analyse der Komplementationslinien. Gesamtproteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle ist die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) gezeigt.

drei unabhängigen Linien zeigte, dass die Expression der HCF244-TMH_{tAPX}-Variante den *hcf244*-Mutantenphänotyp vollständig komplementieren konnte (Abb. 3.22 A). Die Analyse der Proteinlevel ergab in den Komplementationslinien im Vergleich zur *hcf244*-Mutante wieder WT-ähnliche Gehalte von D1, OHP2 und OHP1 (Abb. 3.22 B). Die Menge der HCF244-TMH_{tAPX}-Variante lag in den charakterisierten Linien leicht über der HCF244-Menge im WT (Abb. 3.22 B). Zusammengekommen kann ausgesagt werden, dass die HCF244-TMH_{tAPX}-Variante aktiv ist, und die fehlende Komplementationsfähigkeit des Konstruktes im *ohp2*-Hintergrund daher auf die Abwesenheit der OHPs zurückzuführen ist. Außerdem wird die notwendige Interaktion von HCF244 zu den OHPs durch die Fusion von HCF244 mit der TMH_{tAPX} vermutlich nicht beeinträchtigt.

3.8 Chlorophyllbindestudien mit rekombinanten OHP-Proteinen

Wie oben dargelegt findet die Chl-Bindung bei den Proteinen der LHC-Familie nach bisherigem Wissensstand stets an zwei X-förmig in der Thylakoidmembran angeordneten LHC-TMHs statt (Abschnitt 1.3.4). Diese können wie bei den cyanobakteriellen Hlips (HliC/HliD) bzw. beim LIL3-Protein höherer Pflanzen von zwei verschiedenen Proteinen stammen, die ein Dimer bilden, oder wie bei den LHCPs Teil des selben Proteins sein. Da für die OHPs eine exklusive Heterodimerisierung beschrieben wurde (HEY *et al.* 2018a), und die konservierten, in LHCII an der Chl-Bindung beteiligten Aminosäuren sich als unabdingbar für die Funktion der OHPs herausstellten (Abb. 3.16, 3.19), obwohl gleichzeitig die Fähigkeit zur Heterodimerisierung (und im Fall von OHP2-AAA auch die Interaktion mit HCF244) nicht beeinträchtigt war, wurde die folgende Arbeitshypothese aufgestellt: Eine Chl-Bindung sollte der Beteiligung beider OHPs in äquimolarem Verhältnis bedürfen und auf das Vorhandensein der konservierten Aminosäuren angewiesen sein. Die Kombination von WT- und AAA-OHP-Proteinvarianten sollte zudem die Fähigkeit zur Chl-Bindung verringern oder sogar verhindern.

3.8.1 Methodenetablierung mittels Rekonstitution von LHCB1.1

Zur Untersuchung der Chl-Bindung wurde ein *in vitro*-Rekonstitutionsansatz ausgewählt, der für die LHCPs bereits erfolgreich angewendet wurde (NATALI *et al.* 2014, u.a.). Rekombinant exprimiertes LHCII-Protein in *Inclusion Bodies* wird dabei denaturierend solubilisiert, mit Pigmenten und nichtionischen Detergenzien inkubiert, und abschließend wird die Einnahme der nativen Konformation unter Bindung von Pigmenten ermöglicht. Die rekonstituierten LHCII-Proteine werden dann über eine His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt und von ungebundenen Pigmenten getrennt (für eine ausführliche Beschreibung der Methode siehe Abb. 3.23 A). Um die von NATALI *et al.* (2014) beschriebene Methode zu etablieren, wurde sie mit LHCB1.1 (At1g29920) getestet: Nach Beladen der Ni-NTA-Säule mit dem rekonstituierten Protein und Waschen der Säule war eine dunkelgrün gefärbte Bande am oberen Ende der Säule zu sehen, die beim Spülen der Säule mit 500mM Imidazol eluierte (Abb. 3.23 B). Der restliche Teil der Säule hatte nach dem Waschen wieder die für Ni-NTA-Matrix typische hellblaue Färbung angenommen, was auf das erfolgreiche Auswaschen ungebundener Pigmente hindeutete.

Die Analyse des Eluats mittels *Clear Native*-PAGE (CN-PAGE) zeigte die Anwesenheit pigmentierter Proteinkomplexe von der Größe nativer LHC-Monomere und Dimere, sowie das Vorliegen höherer Oligomere (Abb. 3.23 C). LHCII bindet in der Regel 8 Chl a-, 6 Chl b-, 2 Lutein-, 1 Neoxanthin- und 1 Violaxanthin-Molekül(e) (LIU *et al.* 2004). Die Analyse des Eluats mittels HPLC ergab für zwei unabhängige Rekonstitutionsansätze eine bis auf den verringerten Anteil an Violaxanthin mit den Literaturwerten vergleichbare, relative Pigmentzusammensetzung (Tab. 3.1). Von der Zusammensetzung der eingesetzten Pigmentmischung unterschied sich das rekonstituierte LHCB1.1 vor allem auffallend durch eine Anreicherung an Chl b, Lutein und Neoxanthin.

Im nativen LHCII wird die von den Chl b-Molekülen aufgenommene Anregungsenergie an Chl a weitergegeben. Bei korrekter Faltung und Inkorporation der Pigmente sollte daher bei Anregung von Chl b (470nm) des nativen Komplexes ausschließlich Chl a-Fluoreszenz (680nm) detektierbar

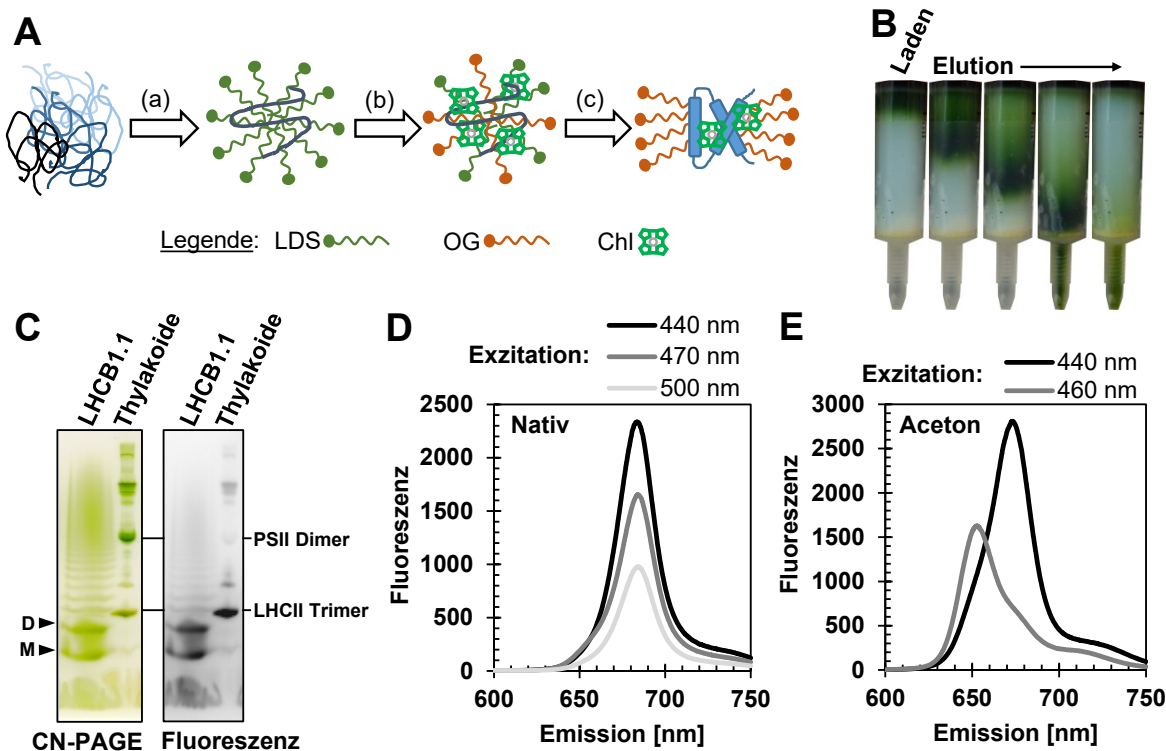


Abbildung 3.23: Rekonstitution von LHCB1.1 mit Pigmenten. Kontroll- und Vorexperiment für die Analyse der Pigmentbindung der OHPs. LHCB1.1 (At1g29920) wurde rekombinant exprimiert, mit Pigmenten rekonstituiert und die Pigmentbindung analysiert. **A**, Schema der Rekonstitution nach NATALI *et al.* (2014). (a) LHCB1-Proteine in angereicherten *Inclusion Bodies* werden mit Lithiumdodecylsulfat (LDS) solubilisiert. (b) Octylglykosid (OG) und Pigmente werden hinzugefügt, es kommt zur Bildung gemischter Micellen. Pigmente lagern sich in die Micellen ein und an die Proteine an. (c) Durch Zugabe von Kaliumchlorid wird unlösliches Kaliumdodecylsulfat gebildet und ausgefällt. LHCB1 kann in Gegenwart von Pigmenten und OG seine native Konformation annehmen. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung mittels His-Tag-Affinitätschromatographie zur Abtrennung ungebundener Pigmente. **B**, Verlauf der Elution der His-Tag-Affinitätschromatographie. Die sich nach Beladen und Auswaschen freier Pigmente am oberen Ende der Säule (HisTrap HP 1ml, GE) befindlichen, rekonstituierten LHCB1.1-Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 500mM Imidazol eluiert. **C**, CN-PAGE-Analyse der rekonstituierten LHCB1.1-Proteine. Die CN-PAGE wurde nach JÄRVİ *et al.* (2011) mit 0,3% Desoxycholat (DOC) in der Probe und 0,05% DOC sowie 0,06% DDM im Kathodenpuffer durchgeführt. Zum Größenvergleich wurden DDM-solubilisierte Thylakoide aufgetrennt. Anschließend wurde mit einem PAM-Imager (FluorCam 700MF, Photon Systems Instruments) die Fluoreszenz der Banden visualisiert. M bezeichnet das LHCB1.1-Monomer, D das Dimer. **D/E**, Emissions-Fluoreszenzspektroskopie der rekonstituierten LHCB1.1-Proteine. Die Fluoreszenz der nativen Komplexe (**D**) bzw. der Pigmente nach Extraktion mit Aceton (**E**) wurde nach Anregung bei den angegebenen Wellenlängen bestimmt. Anregungswellenlängen: 440nm: Chl a; 460/470nm: Chl b; 500nm: Carotinoide.

Tabelle 3.1: Relativer Pigmentgehalt des rekonstituierten LHCB1.1-Proteins. Der von LIU *et al.* (2004) für LHCB bestimmte Pigmentgehalt ist als Referenz angeführt (Literatur), und die mittels HPLC bestimmten Pigmentmengen von zwei unabhängigen Experimenten sowie von der für die Rekonstitution eingesetzten Gesamtpigmentlösung wurden zum Vergleich auf einen Gehalt von 8 Chl a-Molekülen normalisiert.

Experiment	Pigment				
	Chl a	Chl b	Lutein	Neoxanthin	Violaxanthin
#1	8,0	6,0	2,0	1,0	0,2
#2	8,0	5,1	1,5	0,7	0,5
Pigmentlösung	8,0	2,9	1,3	0,4	1,5
Literatur	8	6	2	1	1

sein. Emissions-Fluoreszenzspektroskopische Messungen zeigten genau diesen erwarteten Effekt (Abb. 3.23 D). Zudem wurde auch die über die Carotinoide aufgenommene Energie (500nm) über Chl a-Fluoreszenz wieder emittiert (Abb. 3.23 D). Die Analyse der Chl-Fluoreszenz nach Extraktion der Pigmente in Aceton zeigte sowohl Chl a- als auch Chl b-spezifische Emission bei Anregung mit den entsprechenden Wellenlängen (Anregung bei 440 bzw. 460nm, Emission bei 680 bzw. 650nm, Abb. 3.23 E), wie es für freie Pigmente zu erwarten war. Zusammenfassend konnte die Rekonstitutions-Methode für LHCB1.1 erfolgreich angewandt werden, sodass als nächster Schritt der Versuch der Rekonstitution der OHPs unternommen wurde.

3.8.2 Rekonstitution von OHP1/OHP2

Die Anwendung des Rekonstitutionsansatzes auf die OHPs verlangte zwei Anpassungen des Protokolls: Zum einen befanden sich die rekombinanten OHPs im Gegensatz zu LHCB1.1 nicht in *Inclusion Bodies*, sondern in den nach der Zellyse und Zentrifugation pelletierten *E. coli*-Membranfraktionen. Diese wurden für die OHP1/OHP2-Doppelrekonstitutions-Experimente in entsprechend äquimolaren Mengen beider Proteine eingesetzt, da wie oben beschrieben eine ausschließliche Pigmentbindung des OHP-Heterodimers vermutet wurde. Abgesehen von diesen Abweichungen wurde dem Protokoll von NATALI *et al.* (2014) exakt gefolgt.

Die wiederholte Rekonstitution der OHP1-WT/OHP2-WT-Kombination ergab in drei unabhängigen Experimenten reproduzierbar eine dunkelgrüne Bande am oberen Ende der Ni-NTA-Säule, welche beim Waschen mit 500mM Imidazol eluierte (Abb. 3.24 C/F, Experiment #2 und #3). Im Gegensatz dazu war sowohl bei der Rekonstitution der einzelnen OHP-WT-Proteine (Abb. 3.24 A/B, Experiment #2) als auch bei der Rekonstitution der beiden möglichen OHP-WT/AAA-Kombinationen (Abb. 3.24 D/E, Experiment #3) nur eine schwach grüne Bande während der Elution sichtbar. Gleiche Mengen an Eluat wurden aufgefangen, welche sich erwartungsgemäß als visuell verschieden stark pigmentiert erwiesen (Abb. 3.24 G/H). Die Auftrennung identischer Volumina des Eluats mittels SDS-PAGE ergab, dass in den einzelnen Ansätzen eines Experiments vergleichbare Mengen der jeweiligen OHPs enthalten waren (Abb. 3.24 I/J). Die geringere Pigmentierung von OHP1- bzw. OHP2-WT und OHP1-AAA/OHP2-WT bzw. OHP1-WT/OHP2-AAA gegenüber der OHP1-WT/OHP2-WT-Kombination ist daher nicht durch den Einsatz bzw. die Rekonstitution geringerer Proteinmengen erklärbar. Ein vergleichbarer Proteingehalt bei unterschiedlicher Pigmentierung schlägt sich auch in den deutlich abweichenden Chl a zu Protein-Verhältnissen der Eluate nieder (Abb. 3.24 G/H).

Die Auftrennung gleicher Eluat-Volumina auf CN-Gelen ergab für den OHP1-WT/OHP2-WT-Ansatz pigmentierte Banden verschiedener Größe, wobei interessanterweise nur die unterste dieser Banden eine mittels PAM-Imager detektierbare Fluoreszenz besaß (Abb. 3.25 A/B). Das Bandenmuster der beiden OHP1-WT/OHP2-WT-Ansätze aus Experiment #2 und #3 war vergleichbar. Wie LHCB1.1 wurde auch das OHP1-WT/OHP2-WT-Eluat Fluoreszenz-spektroskopisch analysiert. (Die selben Analysen wurden zwar auch mit allen anderen Eluaten durchgeführt. Da diese Rekonstitutionen aber als nicht erfolgreich angesehen wurden, sind die entsprechenden Daten hier nicht aufgeführt.) Während die Anregung von Chl a (440nm) im nativen Komplex wie erwartet zu Chl a-Emission bei 678nm führte, ergab die Anregung von Chl b (470nm) sowohl Chl a- als

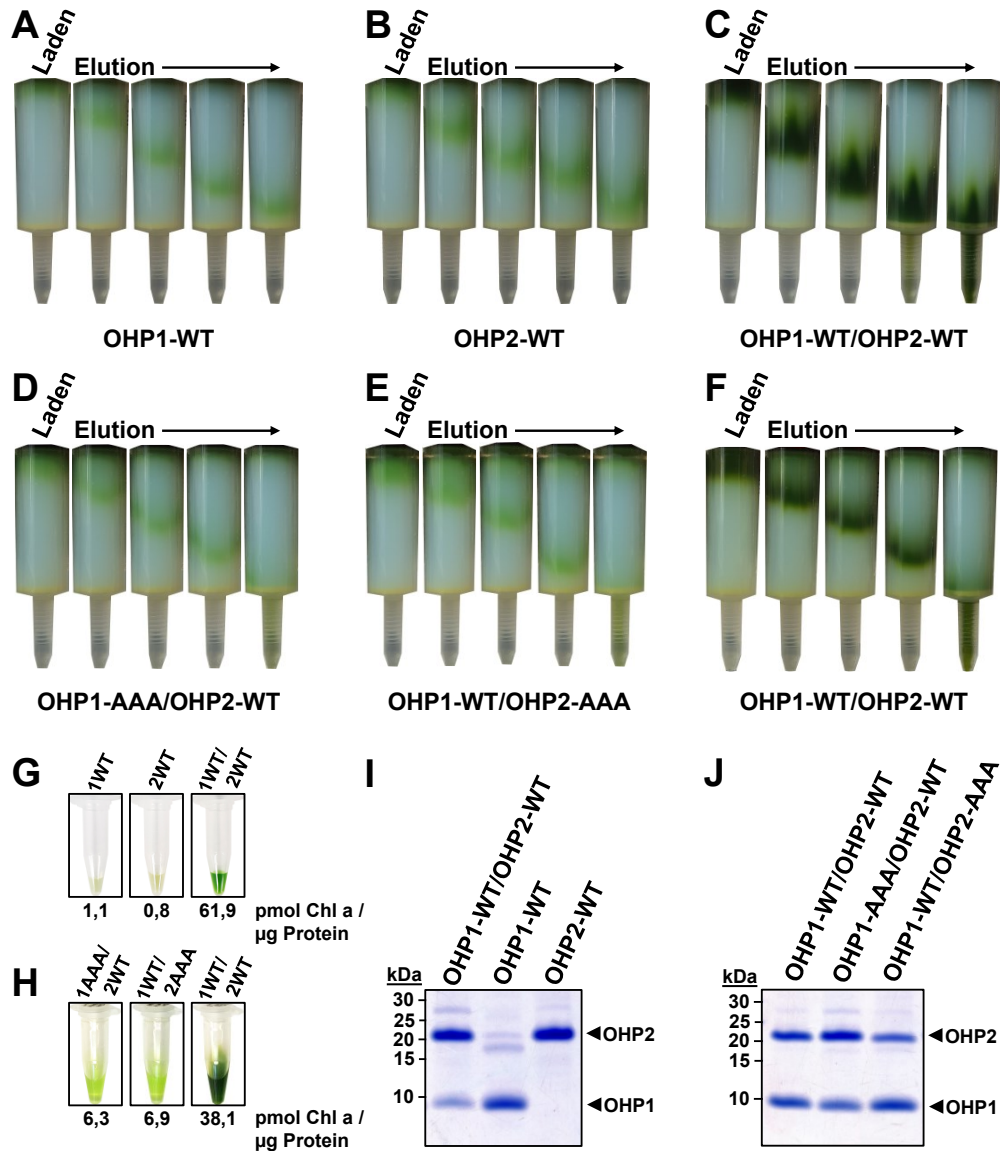


Abbildung 3.24: Rekonstitution von OHP1/OHP2 mit Pigmenten. A-F, Verlauf der Elution der His-Tag-Affinitätschromatographie. Die sich nach Beladen und Auswaschen freier Pigmente am oberen Ende der Säule (HisTrap HP 1ml, GE) befindlichen, rekonstituierten OHP-Proteine/Komplexe wurden durch Spülen der Säule mit 500mM Imidazol eluiert. A-C repräsentieren dabei Experiment #2, D-F Experiment #3 (vgl. Tab. 3.2). G/H, Färbung der Eluate der His-Tag-Affinitätschromatographie. G zeigt die zu A-C gehörigen Eluate, H diejenigen von D-F. Angegeben sind ebenfalls die relativen Chl a zu Protein-Verhältnisse der Eluate in $\text{pmol Chl a } \mu\text{g}^{-1}$ Protein. I/J, Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE. Aufgetragen wurden gleiche Volumina. Die OHP1 bzw. OHP2 entsprechenden Banden sind markiert.

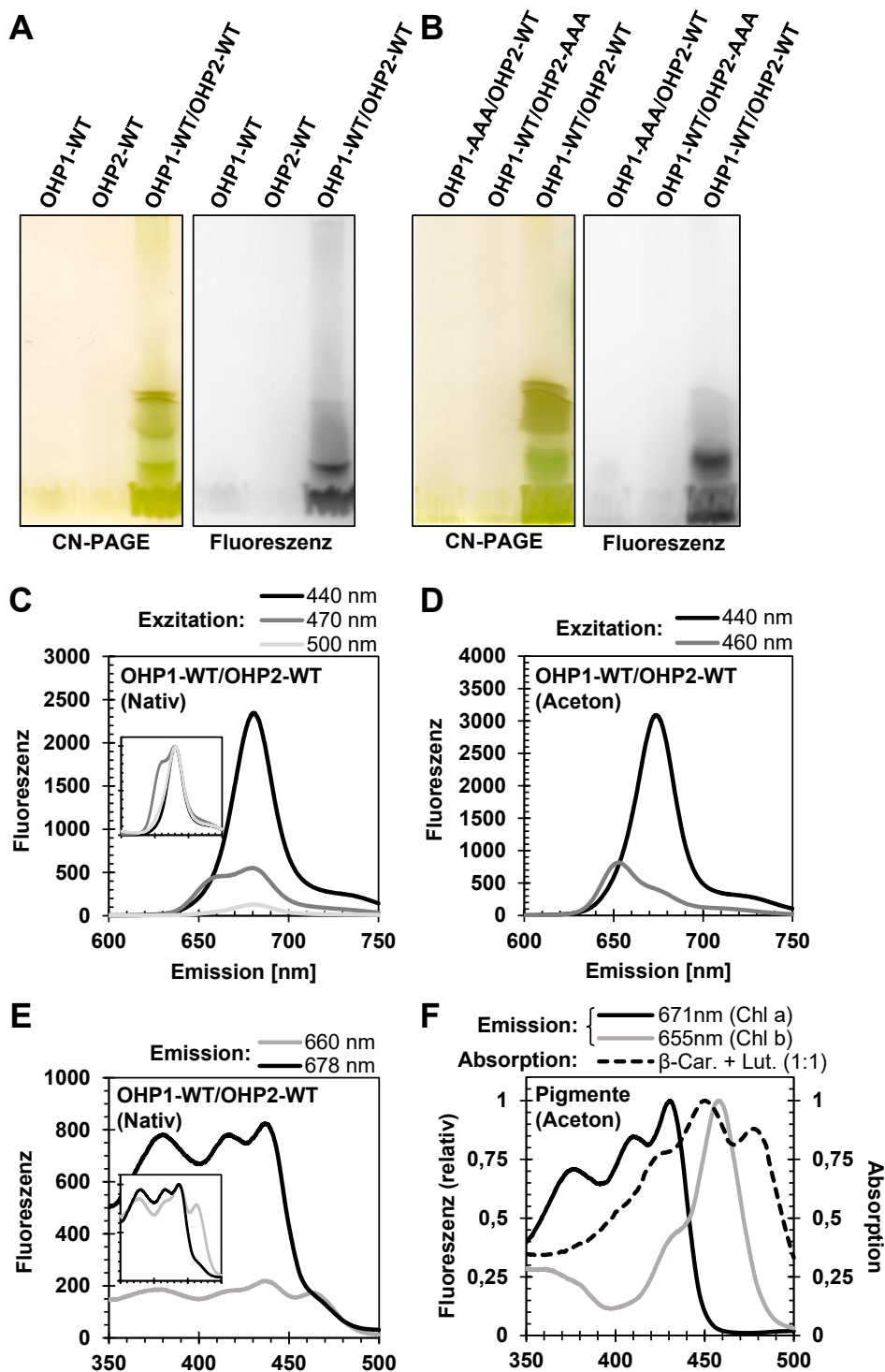


Abbildung 3.25: Analyse der rekonstituierten OHP1/OHP2-Komplexe. A/B, CN-PAGE-Analyse der Eluate der OHP1/OHP2-Rekonstitutionsexperimente. Gleiche Volumina der Eluate aus Experiment #2 (A, vgl. Tab. 3.2), bzw. Experiment #3 (B) wurden nach Järvi *et al.* (2011) mit 0,3% DOC in der Probe und 0,05% DOC sowie 0,06% DDM im Kathodenpuffer auf CN-Gelen aufgetrennt. Anschließend wurde mit einem PAM-Imager die Fluoreszenz der grünen Banden visualisiert. C/D, Emissions-Fluoreszenzspektroskopie des OHP1-WT/OHP2-WT-Eluats (aus Experiment #2). Die Fluoreszenz der nativen Komplexe (C) bzw. der Pigmente nach Extraktion mit Aceton (D) wurde nach Anregung bei den angegebenen Wellenlängen bestimmt. Anregungswellenlängen: 440nm: Chl a; 460/470nm: Chl b; 500nm: Carotinoide. E, Exzitations-Fluoreszenzspektroskopie des OHP1-WT/OHP2-WT-Eluats (aus Experiment #2). Die Fluoreszenz der nativen Komplexe wurde bei 678nm (Chl a) bzw. 660nm (Chl b) nach Anregung im Bereich von 350-500nm gemessen. Die Inlays in C und E zeigen die jeweiligen normierten Spektren. F, Exzitations-Fluoreszenzspektroskopie von Chl a und b (einzeln), bzw. Absorptionsspektroskopie von β -Car und Lutein (äquimolare Mischung) in Aceton. Die Fluoreszenz von Chl (Emission bei 671nm für Chl a und 655nm für Chl b) bzw. die Absorption der Carotinoide wurde im Bereich von 350-500nm gemessen und ist normiert dargestellt.

Tabelle 3.2: Relativer Pigmentgehalt der rekonstituierten OHP1/OHP2-Proteine. Die mittels HPLC für die einzelnen Ansätze und die eingesetzte Pigmentlösung bestimmten Pigmentgehalte wurden zum Vergleich auf 6 Chl a-Moleküle normalisiert. Die Daten von drei unabhängigen Rekonstitutionsexperimenten mit einer äquimolaren Menge an beiden OHPs, sowie je ein Experiment der einzelnen OHPs bzw. der beiden möglichen OHP-WT/AAA-Kombinationen sind gezeigt. Zum Vergleich sind Literaturdaten der HliC-Chl-Bindung angegeben. Die Zahlen in Klammern bei HliC/HliC ergeben sich bei einer Normalisierung auf 6 Chl a-Moleküle. n.d.: nicht detektierbar.

Experiment	Pigment				
	Chl a	Chl b	β -Carotin	Lutein	Neoxanthin
OHP1-WT/OHP2-WT #1	6,0	1,0	0,9	1,0	n.d.
#2	6,0	0,8	0,8	1,3	n.d.
#3	6,0	1,2	0,7	1,1	n.d.
Mittelwert	6,0	1,0 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	—
OHP1-WT (Exp. #2)	6,0	0,8	0,4	1,1	0,6
OHP2-WT	6,0	1,6	0,4	1,5	1,0
OHP1-AAA/OHP2-WT (Exp. #3)	6,0	2,5	0,2	0,3	0,2
OHP1-WT/OHP2-AAA	6,0	2,0	0,2	0,4	0,4
Pigmentlösung	6,0	2,1	0,2	1,0	0,3
HliC/HliD (STALEVA <i>et al.</i> 2015)	6	—	2	—	—
HliC/HliC (SHUKLA <i>et al.</i> 2018)	4 (6)	—	2 (3)	—	—

auch Chl b- Emission (660nm). Dabei war der Anteil der über Chl a emittierten Fluoreszenz höher als der von Chl b (Abb. 3.25 C). Aufgrund dieser Beobachtung, sowie der Tatsache, dass Chl a bei 470nm so gut wie keine Absorption aufweist (Abb. 3.25 F), kann für den rekonstituierten OHP1-WT/OHP2-WT-Komplex eine Energieübertragung von Chl b auf Chl a angenommen werden. Da trotzdem noch Chl b-Fluoreszenz detektierbar war, ist die Energieübertragung aber vermutlich ineffektiv oder findet nicht ausgehend von allen im Eluat vorliegenden Chl b-Molekülen statt. Die spektroskopische Analyse der Aceton-extrahierten Pigmente zeigte wie erwartet Chl a- und Chl b-Fluoreszenz bei Anregung mit den spezifischen Wellenlängen mit einem im Vergleich zu LHCB1.1 höherem Chl a zu Chl b-Verhältnis (Abb. 3.25 D).

Die Anregung der Carotinoide bei 500nm ergab (im Vergleich zu LHCB1.1) nur eine minimale Chl a-Emission (Abb. 3.25 C), wobei die Normierung der Spektren zeigte, dass die Anregungsenergie ausschließlich über Chl a-Fluoreszenz wieder emittiert wurde. Bei der Analyse der nativen Komplexe mittels Exzitations-Fluoreszenzspektroskopie fiel auf, dass die Chl b-Anregung im Bereich von 420-480nm (bei Messung der Emission um 660nm) (Abb. 3.25 E, siehe besonders das Inlay) nicht der alleinigen Anregung freier Chl b-Moleküle entsprach (Abb. 3.25 F): Die Anregung von Chl b in diesem Bereich ähnelte auffallend der Absorption einer äquimolaren Mischung von β -Car und Lutein (vgl. Abb. 3.25 F; die Absorptionsmaxima der freien Carotinoide in Aceton sind vermutlich gegenüber den gebundenen Pigmenten in den roten Spektralbereich verschoben), sodass von einer Energieübertragung der Carotinoide auch auf Chl b ausgegangen werden kann.

Das HliD-Dimer (bzw. HliC/HliD) bindet 6 Chl a- und 2 β -Car-Moleküle (STALEVA *et al.* 2015). Um diese Werte mit den mittels HPLC bestimmten Pigmentgehalten der OHP-Rekonstitutionsansätze vergleichen zu können, wurden die Werte der letzteren auf 6 Chl a-Moleküle normiert (Tab. 3.2). Für die drei unabhängigen OHP1-WT/OHP2-WT-Experimente ergaben sich dabei sehr ähnliche

Werte von im Mittel 1 Chl b-, 1 β -Car- und 1 Lutein-Molekül pro 6 Molekülen Chl a. Dies bedeutet gegenüber der ebenfalls auf 6 Chl a normierten Pigmentlösung eine Abreicherung von Chl b und Neoxanthin (letzteres war nicht mehr im Eluat detektierbar) sowie eine Anreicherung von β -Car (Tab. 3.2). Im Gegensatz dazu entsprach der relative Pigmentgehalt der OHP-WT/AAA-Kombinationen (Experiment #3) mit Ausnahme eines verringerten Lutein-Gehalts exakt der Zusammensetzung der Pigmentlösung, was auf eine unspezifische Bindung der Pigmente an die Proteine hindeutet. In keiner der Rekonstitutionen konnte Violoxanthin nachgewiesen werden, obwohl die Pigmentlösung signifikante Mengen dieses Pigments enthielt (1 Molekül pro 6 Molekülen Chl a, vgl. Tab. 3.1).

Die OHP-Einzel-Rekonstitutionsansätze (Experiment #2) enthielten mit der Pigmentlösung vergleichbare Mengen an β -Car und vergleichbar hohe Gehalte an Neoxanthin. Chl b zeigte aber wie OHP1-WT/OHP2-WT eine Abreicherung. Hierbei muss allerdings angemerkt werden, dass die mittels HPLC detektierten Pigmentmengen in den Einzelansätzen nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze lagen, und daher die Quantifizierung mit Vorsicht zu betrachten ist. Außerdem sollte nicht übersehen werden, dass wie beschrieben der spezifische Pigmentgehalt (d.h. pmol Chl a μg^{-1} Protein) der Einzel- bzw. OHP-WT/AAA-Rekonstitutionen deutlich unter dem der OHP1-WT/OHP2-WT-Rekonstitutionen lag (Abb. 3.24 G/H). Insofern kann bei Betrachtung der jeweils im Vergleich zu den Kontrollansätzen zur OHP1-WT/OHP2-WT-Kombination ähnlichen, *relativen* Gehalte der einzelnen Pigmente nicht auf eine vergleichbare Bindungsfähigkeit geschlossen werden. Es ist im Gegenteil davon auszugehen, dass der Großteil der im Eluat enthaltenen Proteine der Kontrollansätze überhaupt nicht zur Bindung beiträgt, oder aber nur eine unspezifische Pigmentbindung aufweist.

3.9 Analyse der Interaktion von OHP2 mit dem plastidären Ribosom

Da die Funktion des OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes mit der D1-Synthese in Verbindung gebracht werden konnte, schien eine physische Interaktion zum plastidären Ribosom denkbar. In *Synechocystis* wurde zudem HliD zusammen mit Ycf39 sowie ChlG in einem Komplex mit Ribosomen nachgewiesen (CHIDGEY *et al.* 2014). Als besonders vielversprechend für eine solche Interaktion in *Arabidopsis* wurde der ProRS-Abschnitt von OHP2 angesehen: Prolin-reiche Sequenzen können unter anderem als Interaktionsstellen zu SH3-Domänen dienen (KANEKO *et al.* 2008). In der großen Untereinheit des Ribosoms verfügen die beiden ribosomalen Proteine L19 (RPL19) und RPL24 über SH3-like Domänen. Während RPL19 strukturell an der Schnittstelle der 30S- und 50S-Untereinheiten lokalisiert ist, befindet sich RPL24 an der der 30S-Untereinheit abgewandten (und damit der Thylakoidmembran zugewandten) Seite der 50S-Untereinheit, und würde sich daher besonders als Interaktionspartner für OHP2 anbieten (AHMED *et al.* 2017).

Um eine potentielle Interaktion von OHP2 mit dem Ribosom zu untersuchen, wurden plastidäre Ribosomen aus *P. sativum*-Keimlingen mittels Ultrazentrifugation angereichert, mit rekombinant exprimiertem OHP2 bzw. anderen Kontroll-Proteinen inkubiert, sowie anschließend auf eine mögliche Komplexbildung per Größenausschlusschromatographie untersucht. Die Ribosomen, repräsentiert hier durch die Detektion des Proteins RPL4, eluierten als hochmolekularer, schmaler Peak in den Fraktionen 2-3 (Abb. 3.26 A). Als Positivkontrolle hinsichtlich einer Bindung wurde cpSRP54 eingesetzt, für welches bereits eine Interaktion mit dem plastidären Ribosom beschrieben wurde (ZIEHE *et al.* 2017). Während cpSRP54 alleine in den Fraktionen 6-9 eluierte, konnte ein kleiner Teil des Proteins bei Inkubation mit Ribosomen in den Fraktionen 2-3 nachgewiesen werden (Abb. 3.26 B). Dies zeigt eine Bindung an. Als Negativkontrolle wurde RIBA1 – das bifunktionale Enzym am Beginn der Riboflavin-Biosynthese (HILTUNEN *et al.* 2012) – eingesetzt, für welches erwartungsgemäß keine Verschiebung der Elution, und demnach keine Bindung an die Ribosomen beobachtet werden konnte (Abb. 3.26 C).

Bei der Analyse des Volllängen-OHP2-Proteins (OHP2-VL) wurde beobachtet, dass das Protein unerwarteterweise über die ganze Länge des Gradienten verteilt eluierte (Abb. 3.26 D). Der hauptsächliche Elutionspeak lag dabei in den Fraktionen 2-5, und somit in dem Bereich, in welchem auch die Ribosomen eluierten. Die Elution in den frühen, normalerweise hochmolekulare Komplexe/Proteine enthaltenden Fraktionen deutet auf eine Aggregation des rekombinanten Proteins hin. Als Ursache der Aggregation von rekombinantem OHP2 wurde die hydrophobe TMH vermutet. Da für das Volllängen-OHP2 aufgrund der frühen Elution keine Aussage über eine Bindung an die Ribosomen möglich war, wurde ebenfalls die OHP2-ΔC-Variante (s.o.) rekombinant exprimiert und für den Interaktionsassay eingesetzt. Es zeigte sich, dass dieses Protein überwiegend in den Fraktionen 9-11, und damit gemäß seiner erwarteten Größe eluierte (Abb. 3.26 E). Im Gegensatz zu cpSRP54 wurde bei der Inkubation mit Ribosomen aber keine Änderung des Elutionsverhaltens beobachtet. Eine Interaktion von OHP2 mit dem plastidären Ribosom erscheint daher unwahrscheinlich. Aufgrund der Verwendung von *P. sativum*-Ribosomen kann jedoch keine endgültige Aussage über die Interaktion zum *Arabidopsis*-Ribosom getroffen werden.

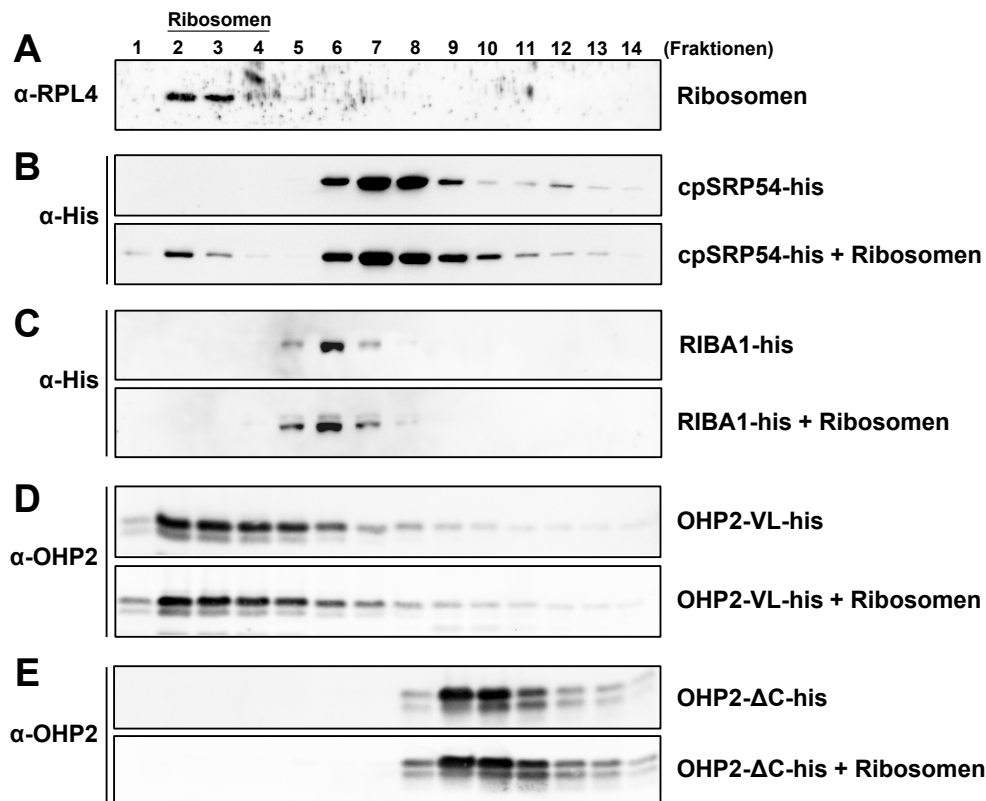


Abbildung 3.26: Analyse der Interaktion von OHP2 mit dem plastidären Ribosom. Western Blot-Analysen von Größenausschlusschromatographie-Läufen mit rekombinanten Proteinen und *P. sativum*-Ribosomen. Plastidäre Ribosomen wurden exakt nach dem Protokoll von RIVERA *et al.* (2015) aus 14 Tage alten, unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht, $100\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) angezogenen *P. sativum*-Keimlingen extrahiert. $25\mu\text{g}$ Ribosomen (bezogen auf die Proteinkonzentration) wurden mit einer äquivalenten Menge an rekombinantem Protein 1h bei 4°C vorinkubiert, und anschließend auf einer Superdex 200 Increase 3.2/300-Säule ($2,4\text{ml}$ Säulenvolumen) mittels Äkta FPLC aufgetrennt (Puffer: 50mM K-PO_4 pH 7,6, 100mM NaCl , 2% Glycerin). Nach dem Durchfluss von 1ml wurden 14 Fraktionen von je $100\mu\text{l}$ aufgefangen und per SDS-PAGE und Western Blot analysiert. **A**, Ribosomen alleine; detektiert wurde RPL4. **B**, Positivkontrolle mit cpSRP54. **C**, Negativkontrolle mit RIBA1. **D**, Analyse von Volllängen-OHP2. **E**, Analyse der OHP2- Δ C-Variante.

4 Diskussion

4.1 Die Anwesenheit beider OHP-Varianten ist unabdingbar für eine normale Thylakoidmembranbiogenese

Das Fehlen der OHPs bewirkt eine selektive Beeinträchtigung von PSII. Proteinanalysen von *ohp1* und *ohp2* zeigten eine drastische Verringerung von PSII-Kernuntereinheiten sowie eine weniger extensive, aber detektierbare Verringerung von PSI-Kernuntereinheiten (BECK *et al.* 2017; LI *et al.* 2018; MYOUGA *et al.* 2018). Die von BECK *et al.* (2017) beschriebene, völlige Abwesenheit von PSI-Kernuntereinheiten in *ohp1* konnte allerdings von LI *et al.* (2018) und MYOUGA *et al.* (2018) nicht bestätigt werden. Während BECK *et al.* (2017) und MYOUGA *et al.* (2018) *ohp1* als Mutante mit drastischerem makroskopischen Phänotyp als *ohp2* beschrieben, stellte sich die Situation in der vorliegenden Arbeit reproduzierbar als entgegengesetzt dar: *ohp2* zeigte eine stärkere Beeinträchtigung als *ohp1* (vgl. z. B. Abb. 3.16 A, 3.19 A und 3.5 B). Angesichts der Tatsache, dass OHP2 für die Stabilisierung von OHP1 und HCF244 nötig ist (s.u.), und die *ohp2*-Mutante daher (zusätzlich zu den für den Verlust von OHP2 spezifischen Effekten) auch die Effekte von *ohp1* zeigen sollte, ist ein prägnanter ausgeprägter *ohp2*-Mutantenphänotyp als konsequent anzusehen. Die starke Beeinträchtigung der T-DNA-Insertionslinien bedeutet zudem auch, dass nicht in vollem Umfang von primären Effekten ausgegangen werden kann, sondern mit Gewissheit eine Vielzahl an sekundären Effekten infolge der OHP-Defizienz eine Rolle spielt. Der Einsatz des VIGS-Systems war daher gegenüber den T-DNA-Linien der vielversprechendere Ansatz zur Ermittlung des primären Effekts der Inaktivierung der OHP-Gene.

Die Analyse der VIGS-OHP1 und VIGS-OHP2-Linien zeigte früh, dass es sich bei VIGS-OHP1 um einen Sonderfall handeln musste: Während VIGS-OHP2 einen verringerten Chl-Gehalt, ein niedrigeres Chl a/b-Verhältnis sowie ein stark von den VIGS-GFP-Linien abweichendes Muster der photosynthetischen Komplexe in BN-PAGE-Analysen aufwies, verhielt sich VIGS-OHP1 in allen Analysen wie die Kontrolle (HEY *et al.* 2018a, Fig. 2A, D, 4B). Dass diese phänotypische Abweichung von *ohp1* auf den späteren Zeitpunkt des OHP1-Silencings in VIGS-OHP1 zurückzuführen war, konnte durch die Analyse der OHP1-RNAi-Linien (die grundsätzlich ein zu VIGS-OHP1 vergleichbares Konstrukt zur OHP1-Inaktivierung verwendeten) bestätigt werden (Abb. 3.8, 3.9): Die OHP1-RNAi-Linien waren phänotypisch stark beeinträchtigt und zeigten verringerte Gehalte an PSII-Kernuntereinheiten. Demgegenüber waren die untersuchten photosynthetischen Proteine in VIGS-OHP1 nicht von VIGS-GFP verschieden. Ergänzend zeigte die Analyse von VIGS-OHP2 jedoch, dass spezifisch PSII-Kernuntereinheiten verringert waren (HEY *et al.* 2018a, Fig. 4A). Insofern ist die von LI *et al.* (2018) und MYOUGA *et al.* (2018) beobachtete Destabilisierung von PSI-Kernuntereinheiten in den *ohp*-Mutanten vermutlich als sekundärer Effekt anzusehen. In der Tat ist bereits mehrfach beschrieben worden, dass eine Beeinträchtigung von PSII in Mutanten von PSII-Assemblierungsfaktoren (z. B. *pam68* und *hcf136*, MEURER *et al.* 1998; ARMBRUSTER *et al.* 2010) eine sekundäre Destabilisierung von PSI nach sich ziehen kann (MEURER *et al.* 1998). Im Sinne der spezifischen Destabilisierung von PSII-Untereinheiten in VIGS-OHP2 konnten die Veränderungen im Muster der BN-PAGE-Analysen (HEY *et al.* 2018a, Fig. 4B) auf eine beeinträchtigte Assemblierung der PSII-Komplexe zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zur starken Destabilisierung der PSII-Untereinheiten erwies sich die Akkumulation von sowohl LHCA als auch LHCB in VIGS-OHP2 (und *ohp2*) als im Wesentlichen unbeeinträchtigt (BECK *et al.* 2017; LI *et al.* 2018; MYOUGA *et al.* 2018; HEY *et al.* 2018a, Fig. 4A; Abb. 3.9 C). Dies drückte sich auch im reduzierten Chl a/b-Verhältnis aus (HEY *et al.* 2018a, Fig. 2D) und unterstützt die Hypothese, dass OHP1 und OHP2 spezifisch an der Akkumulation der plastidencodierten PSII-Untereinheiten, nicht aber an der posttranslationalen Integration der kerncodierten LHCPs in die Thylakoidmembran beteiligt sind.

Die Thylakoidmembranstruktur in OHP-defizienten Pflanzen zeigt Anzeichen von Lichtstress

Die Analyse der Thylakoidmembranstruktur in *ohp1* und *ohp2* mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie zeigte stark entwicklungsbeeinträchtigte Chloroplasten mit auffällig aufgeschwollenen Thylakoiden (MYOUGA *et al.* 2018). In *ohp1* waren z.T. keine Stromathylakoide sichtbar (BECK *et al.* 2017). Die vollständige Inaktivierung der OHP-Gene macht also eine normale Thylakoidmembranbiogenese unmöglich. Aufgrund der oben geschilderten, erwartbar starken sekundären Effekte in den T-DNA-Linien sind diese Ergebnisse in der Beschreibung der OHP-Inaktivierung jedoch vermutlich nicht zielführend. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die VIGS-OHP und OHP1-RNAi-Linien elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 3.14): Die OHP1-RNAi-Linien besaßen grundsätzlich mit dem WT vergleichbare, funktionale Chloroplasten mit Granastapeln und Stromathylakoiden, und unterschieden sich damit deutlich von *ohp1*. Die Stromathylakoide waren z.T. geschwollen bzw. erschienen fragmentiert. Geschwollene Thylakoide sind grundsätzlich als Reaktion auf Starklichtstress zu beobachten (KIRCHHOFF 2014; PRIBIL *et al.* 2014). Dies liegt vermutlich daran, dass den luminal vorliegenden, am PSII-Reparaturprozess beteiligten Faktoren, wie den Deg-Proteasen, durch die Vergrößerung des Lumens der Zugang zum PSII erleichtert wird (KIRCHHOFF 2014). Dass die untersuchten OHP1-RNAi-Linien unter Normallichtbedingungen angezogen wurden und dennoch geschwollene Thylakoide aufwiesen, deutet womöglich auf eine erhöhte Aktivität des PSII-Reparaturzyklus in OHP1-RNAi hin. Dies könnte in einer höheren Lichtsensibilität der PSII-Komplexe begründet sein. Interessanterweise wurden fragmentierte Stromathylakoide, wie sie deutlich in Linie #16 und in milderer Form auch in Linie #11 auftraten, ebenfalls in der *lpe1*-Mutante beobachtet (JIN *et al.* 2018). Der Grund dafür ist unklar, LPE1 ist allerdings (ebenfalls) an den frühen PSII-Syntheseschritten beteiligt (s.u.).

Die VIGS-OHP1-Linien zeigten geschwollene Thylakoide, die allerdings auch in der VIGS-GFP-Kontrolle zu sehen waren (Abb. 3.14). Dies lässt sich möglicherweise mit dem (durch den experimentellen Ablauf des VIGS-Assays vorgegebenen) vergleichbar hohen Alter der Pflanzen erklären. In VIGS-OHP2 waren z.T. sehr große blockweise Grana-Stapel erkennbar. Angesichts der Tatsache, dass nur PSII, nicht aber die zugehörigen LHCIIs verringert waren, lassen sich Parallelen zu den von BELGIO *et al.* (2015) beschriebenen Ergebnissen erkennen: In der angeführten Arbeit wurde die Synthese der Photosysteme *in planta* durch Anzucht in Gegenwart des Plastiden-spezifischen Translationsinhibitors Lincomycin inhibiert, während die kerncodierten LHCPs weiterhin synthetisiert werden konnten. Dies führte zur Bildung von Supergrana – Grana-Stapeln mit extrem vielen Schichten – welche durch die Fähigkeit von LHCIIs zur Selbstassemblierung der dreidimensionalen Struktur der Thylakoide erklärt wurde (BELGIO *et al.* 2015). Es ist zu vermuten, dass in VIGS-OHP2 mit den LHCIIs Ähnliches geschieht, wenn auch nicht in gleich starker Weise. Die großen Grana-Stapel ähneln auch den Grana-Stapeln in der *hcf136*-Mutante (MEURER *et al.* 1998). HCF136 ist

in vielfacher Weise an den frühen Syntheseschritten von PSII beteiligt (vgl. Abschnitt 1.1.2.2). Es sollte bei der Einschätzung der TEM-Bilder aber insgesamt beachtet werden, dass Mutanten von PSII-Assemblierungsfaktoren keinen einheitlichen Phänotyp in der TEM-Analyse aufweisen (PRIBIL *et al.* 2014). Vermutlich sind sekundäre Effekte ein wesentlicher Faktor, z. B. wenn aufgrund der Abwesenheit bestimmter Faktoren andere, ebenfalls direkt oder indirekt an der Etablierung der Thylakoidmembranstruktur beteiligte Faktoren destabilisiert werden.

In VIGS-OHP2 war weiterhin die Abwesenheit von Stärkegranula zu erkennen (Abb. 3.14), was auf die beeinträchtigte Photosyntheseleistung dieser Pflanzen zurückzuführen ist. Zudem waren pro Chloroplast deutlich mehr Plastoglobuli als in der Kontrolle bzw. VIGS-OHP1 zu erkennen. Obwohl die exakte Funktion der Plastoglobuli unklar ist, korreliert deren Auftreten mit dem Vorliegen von Licht- bzw. abiotischem Stress (BRÉHÉLIN *et al.* 2008; NACIR *et al.* 2013). Vermutlich ist die höhere Anfälligkeit von VIGS-OHP2 gegenüber Lichtstress daher der Grund für die Zunahme der Plastoglobuli.

4.2 Ein OHP1-OHP2-HCF244-Komplex ist an der Synthese der D1-Untereinheit beteiligt

OHP1, OHP2 und HCF244 interagieren miteinander Vergleichbar zur Interaktion von Ycf39 mit den Hlips in Cyanobakterien (KNOPPOVÁ *et al.* 2014) konnte eine Interaktion der OHPs untereinander sowie mit HCF244 nachgewiesen werden: Der M-Teil von OHP2 interagiert in BiFC-Assays spezifisch mit HCF244, und in StrepII-Tag Pulldown-Assays waren beide OHPs dazu in der Lage, die jeweils andere OHP-Variante sowie HCF244 zu präzipitieren (HEY *et al.* 2018a, Fig. 1A-D). Die fehlende Interaktion der OHPs untereinander sowie die von OHP1 mit HCF244 im BiFC-Assay sind vermutlich auf den störenden Einfluss der im Vergleich zu den OHP-Zielproteinen größtmäßig überlegenen YFP-Hälften zurückzuführen. In Pulldown-Assays war dessen ungeachtet auch das umgekehrte Experiment, d.h. die Co-Präzipitation der OHPs über getaggtetes HCF244 erfolgreich (HEY *et al.* 2018a, Fig. 1E). Die StrepII-getaggten OHP-Varianten konnten aufgrund ihres höheren Molekulargewichts von den endogenen Proteinen unterschieden werden. Da jeweils nur die andere OHP-Variante, nicht aber die gleiche endogene Variante mit beiden OHPs co-präzipitiert wurde, lässt sich das Vorliegen von OHP-Homodimeren negieren. Stattdessen kann von einer ausschließlichen Bildung von Heterodimeren ausgegangen werden. Die Interaktion der OHPs untereinander sowie mit HCF244 wurde von LI *et al.* (2018) und MYOUGA *et al.* (2018) ebenfalls berichtet.

Die drei Proteine waren in den Stromalamellen der Thylakoide angereichert, und bei Solubilisierung von Thylakoiden mit DDM und Auftrennung mittels BN-PAGE konnten drei Komplexe unterschiedlichen Molekulargewichts identifiziert werden (HEY *et al.* 2018a, Fig. 1F-G): Diese befanden sich im Bereich freier Proteine (was vermutlich freiem Komplex oder monomeren Proteinen entspricht), sowie auf Höhe des LHCII-Dimers und des PSII-Monomers. Komplexe ähnlicher Größe wurden ebenfalls von MYOUGA *et al.* (2018) beobachtet, zusätzlich wurde dort ein weiterer Komplex knapp oberhalb des LHCII-Trimers detektiert. MYOUGA *et al.* (2018) detektierten allerdings statt des endogenen OHP1-Proteins eine mit einem 10xMyc-Tag versehene Variante, von welcher nicht zwangsläufig ein dem endogenen Protein identisches Verhalten vorausgesetzt werden kann. Die drei beschriebenen Positionen im BN-Gel konnten in weiteren Experimenten

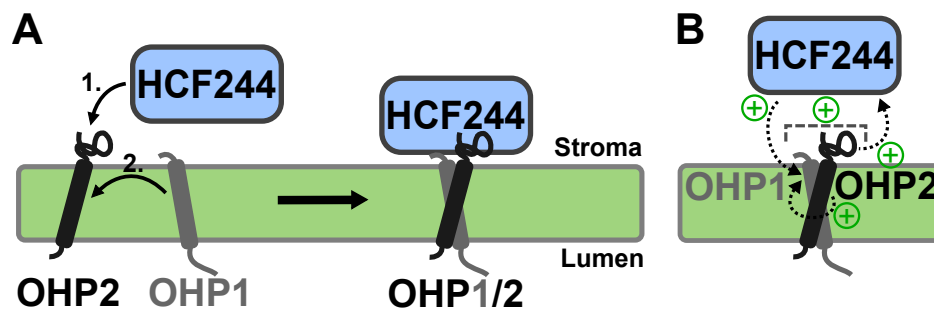


Abbildung 4.1: Assemblierung und gegenseitige Stabilisierung innerhalb des OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes. A, Schrittweise Assemblierung des OHP1-OHP2-HCF244-Heterotrimers (entnommen aus HEY *et al.* 2018a, Fig. 9A). Zuerst bindet HCF244 auf der Stromaseite der Thylakoidmembran an membranständiges OHP2, welches seinerseits vermutlich frei vorliegen oder an andere Komplexe gebunden sein kann. Das OHP2-HCF244-Heterodimer ist bereits partiell aktiv, die volle Aktivität des Komplexes wird allerdings erst durch die Assoziation von OHP1 erreicht. OHP1 bindet dabei sowohl OHP2 in der Membran als auch das stromale HCF244. B, Stabilisierung innerhalb des Komplexes. Gegenseitige positive Effekte sind durch ⊕ gekennzeichnet. Zudem ist die 'molekulare Klammerfunktion' von HCF244 hinsichtlich des OHP-Heterodimers hervorgehoben.

zuverlässig reproduziert werden (vgl. Abb. 3.18 C). Interessanterweise war in der *hcf244*-Mutante (d.h. in Abwesenheit von OHP1 und HCF244, s.u.) OHP2 an den gleichen Positionen detektierbar (HEY *et al.* 2018a, Fig. 7E), was darauf schließen lässt, dass die Interaktion von OHP2 zu weiteren Bindungspartnern für die Kopplung des heterotrimeren OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes an andere Proteine/Komplexe verantwortlich ist, und diese Kopplung auch in Abwesenheit von OHP1 und HCF244 stattfindet.

OHP1, OHP2 und HCF244 stabilisieren sich gegenseitig Die Analyse der Proteinlevel von OHP1, OHP2 und HCF244 in den jeweiligen Mutanten führte zu folgenden Erkenntnissen: (i) Die Abwesenheit von OHP1 bewirkte leicht verringerte OHP2-Level in *ohp1*, OHP1-RNAi und VIGS-OHP1, wobei HCF244 ebenfalls leicht verringert war (HEY *et al.* 2018a, Fig. 2C, 7A; Abb. 3.8 C, 3.16 C). (ii) In der *ohp2*-Mutante bzw. den VIGS-OHP2-Linien waren sowohl OHP1 als auch HCF244 bis an die Nachweisgrenze verringert (HEY *et al.* 2018a, Fig. 2C, 7A; Abb. 3.15 C). Dies bedeutet, dass OHP2 für die Stabilität der beiden anderen Bindungspartner des heterotrimeren Komplexes von essentieller Bedeutung ist. (iii) Die Abwesenheit von HCF244 (*hcf244* bzw. VIGS-HCF244) schließlich hatte einen destabilisierenden Effekt auf beide OHPs, wobei OHP1 besonders stark betroffen war: In Abwesenheit von HCF244 blieb kaum detektierbares OHP1 zurück (HEY *et al.* 2018a, Fig. 7C, Suppl. Fig. 7D; Abb. 3.11 C). Diese differentiellen Stabilitäten der einzelnen Proteine ergab folgendes Modell einer sequentiellen Assemblierung des heterotrimeren OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes (Abb. 4.1 A): An frei vorliegendes bzw. Komplex-gebundenes OHP2 bindet demnach zunächst HCF244 auf der Stromaseite der Thylakoidmembran. HCF244 bindet an den M-Teil von OHP2. Im Eluat des OHP2-strepII-Tag Pulldowns konnten zusätzliche, jedoch noch unidentifizierte Proteine nachgewiesen werden, die die weiteren Bindungspartner von OHP2 darstellen könnten (HEY *et al.* 2018a, Suppl. Fig. 4). Der OHP2-HCF244-Komplex ist bereits partiell aktiv (s.u.), für eine volle Aktivität (die vor allem unter Stressbedingungen benötigt wird, s.u.) ist aber die Assoziation von OHP1 unabdingbar. Zum OHP2-HCF244-Komplex assoziiert OHP1 in der Membran mit OHP2, und bindet zusätzlich an HCF244. HCF244 wirkt als eine Art 'molekulare Klammer', welche das OHP-Heterodimer *in vivo* stabilisiert (Abb. 4.1 B). Im Zusammenhang mit den geschilderten Protein-Destabilisierungs-Effekten sollte zudem nicht unerwähnt bleiben,

dass es sich sämtlich um spezifisch posttranslationale Effekte handelte: Die zu den reduzierten Proteinmengen gehörigen Transkripte blieben in allen untersuchten Linien mindestens auf dem WT-Level oder waren sogar erhöht.

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit stützen das oben und in HEY *et al.* (2018a) beschriebene Modell weiter (Abb. 3.11 C): Die Überexpression der einzelnen OHP-Varianten im *hcf244*-Hintergrund führte dazu, dass sich der OHP2-Gehalt von etwa 20% der WT-Menge in *hcf244* auf 60-80% in den *hcf244*/OHP2-OX-Linien erhöhte, während OHP1 in *hcf244*/OHP1-OX nur 10% der WT-Menge (von 3% in *hcf244*) erreichte. Dies unterstützt die Theorie, dass OHP2 in Abwesenheit von HCF244 akkumulieren kann, während OHP1 dazu nicht in der Lage ist. Noch interessanter ist jedoch die Beobachtung, dass sich OHP1 in den *hcf244*/OHP2-OX-Linien (trotz unverändert hoher OHP1-Level) nicht vom Gehalt in *hcf244* unterschied: Dies kann als weiterer Beleg dafür angesehen werden, dass für die Stabilisierung von OHP1 *in vivo* das Vorliegen von OHP2 zwar notwendig, aber keinesfalls hinreichend ist, sondern zusätzlich des Vorliegens von HCF244 und dessen stabilisierenden Einflusses bedarf.

Der OHP1-OHP2-HCF244-Komplex ist an der Synthese des D1-Proteins beteiligt Die stark verringerte Menge von PSII in Abwesenheit von OHP1, OHP2 und HCF244 in VIGS-OHP2 war nicht auf eine Reduktion der plastidären Transkription der *psb*-Gene zurückzuführen. Stattdessen zeigten *in vivo*-Labeling-Experimente, dass die D1-Proteinsynthese in VIGS-OHP2 drastisch gegenüber VIGS-GFP verringert war (HEY *et al.* 2018a, Fig. 5A-C). Zudem war das verbleibende D1-Protein in VIGS-OHP2 deutlich sensibler gegenüber Starklicht, sodass bereits wenige Stunden Starklicht-Exposition von VIGS-OHP2 in Gegenwart des Translations-Inhibitors Lincomycin zu einer Reduktion von D1 auf nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze führte (HEY *et al.* 2018a, Fig. 5D). Unter Berücksichtigung der Chl- und Carotinoid-Bindeeigenschaft des OHP-Heterodimers (vgl. Abschnitt 4.4) ist von einer Beteiligung des OHP-HCF244-Heterotrimers an der Synthese des RC-Komplexes, mindestens aber an der D1-Synthese auszugehen: Das OHP-Heterodimer ist dabei vermutlich für die co-translationale Beladung von pD1-Proteinen mit Pigmenten verantwortlich (Abb. 4.2 A). Es ist bekannt, dass die pD1-Stabilität von der Pigmentbindung abhängt (EICHACKER *et al.* 1996; HE *et al.* 1998): Bleibt die Versorgung mit Chl aus, wird das Protein abgebaut. Zusätzlich zur Anlieferung von Chl könnte das OHP-Heterodimer zur Dissipation von Anregungsenergie beitragen, und somit während der D1-Assemblierung eine frühzeitige Photoschädigung des Proteins verhindern (Abb. 4.2 A). LI *et al.* (2018) und MYOUGA *et al.* (2018) kamen in ihren Analysen zu ähnlichen Schlüssen in Bezug auf die Funktion der OHPs. Im Zusammenhang mit der Chl-Anlieferungsfunktion der OHPs hinsichtlich pD1 bleibt jedoch offen, woher die entsprechenden Chl-Moleküle stammen: Weder eine Interaktion der OHPs mit LIL3, noch eine direkte Interaktion zu CHLG konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden (HEY *et al.* 2018a, Fig. 1A, E, Abb. 3.6, 4.2 B). Während die Interaktion der cyanobakteriellen Hlips zu ChLG bereits etabliert ist, deuten Studien in Cyanobakterien aber ebenfalls auf die fehlende Hlip/OHP-CHLG-Interaktion in Pflanzen hin (CHIDGEY *et al.* 2014; PROCTOR *et al.* 2018).

MYOUGA *et al.* (2018) beschrieben HCF136 als weiteren Interaktionspartner des OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes. HCF136 war jedoch weder in *hcf244* noch in den *ohp*-Mutanten destabilisiert (LI *et al.* 2018), sodass eine Beteiligung an den gegenseitigen Stabilisierungsprozessen innerhalb

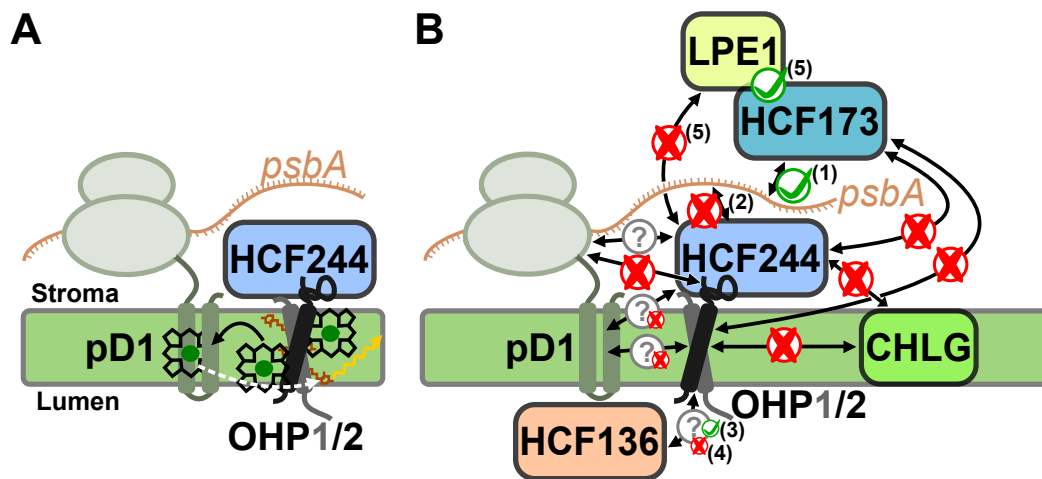


Abbildung 4.2: Funktion des OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes und Einordnung weiterer untersuchter Interaktionen. A, Das OHP1-OHP2-Dimer bindet Chl und Carotinoide (vgl. Abschnitt 4.4) und leitet vermutlich Chl co-translational an pD1 weiter. Über gebundene β -Car- bzw. Lutein-Moleküle kann möglicherweise Anregungsenergie von PSII-Assemblierungsintermediaten dissipiert werden (weißer Pfeil). Die molekulare Funktion von HCF244 ist unklar. B, Untersuchte Interaktionen von OHP1, OHP2 und HCF244 zu anderen Proteinen. Pfeile bezeichnen Protein-Protein- bzw. Protein-RNA-Interaktionen. Die einzelnen Interaktionen sind als positiv (✓), negativ (⊗) bzw. unbekannt (?) bewertet. Die doppelte Markierung der D1-HCF244 bzw. D1-OHP-Interaktionen deutet darauf hin, dass diese Interaktionen in der vorliegenden Arbeit zumindest mit dem reifen D1-Protein nicht beobachtet werden konnten, eine Interaktion mit dem unreifen (p)D1-Protein während dessen Synthese jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. Für die HCF136-OHP-Interaktion bestehen widersprüchliche Angaben. Aus der Literatur entnommene Interaktionen sind wie folgt gekennzeichnet: (1) SCHULT *et al.* 2007, (2) LINK *et al.* 2012, (3) MYOUGA *et al.* 2018, (4) LI *et al.* 2018, (5) JIN *et al.* 2018.

des OHP-HCF244-Interaktionsnetzwerkes ausgeschlossen werden kann. Zudem migrierte HCF136 in solubilisierten und mittels BN-PAGE analysierten Thylakoiden nicht zusammen mit dem OHP-HCF244-Komplex (LI *et al.* 2018) (Abb. 4.2 B). HCF136 ist unter anderem an der Bildung des RC-Komplexes aus den D1- und D2-Modulen beteiligt (vgl. Abschnitt 1.1.2). Eine Interaktion von HCF136 mit den OHPs zur Koordination der Weitergabe des über die OHPs mit Pigmenten ausgestatteten, fertig synthetisierten (p)D1-Proteins an HCF136 wäre daher ein sinnvolles Szenario einer Zusammenarbeit der OHPs mit HCF136 im Rahmen der PSII-Assemblierung. HCF136 ist ebenfalls an der CP47-Synthese beteiligt, bei welcher es vermutlich die TMHs von CP47 in einer für die Pigmentaufnahme günstigen Position hält. Eine vergleichbare Funktion ließe sich auch für die D1-Synthese postulieren, was eine Pigmentabgabe an pD1 durch das OHP-Dimer erleichtern könnte. Angesichts der uneindeutigen Datenlage bzgl. der HCF136-OHP-Interaktion kann darüber zum derzeitigen Zeitpunkt aber keine definitive Aussage getroffen werden. Eine transiente Interaktion, die sich nicht zwangsläufig in der Co-Migration von HCF136 mit den OHPs in BN-Gelen niederschlagen würde, kann nicht ausgeschlossen werden.

In der *Synechocystis ycf48⁻*-Mutante war nicht nur die PSII-Synthese, sondern auch die PSII-Reparatur beeinträchtigt (KOMENDA *et al.* 2008). Bei der Betrachtung weiterer an der D1-Synthese beteiligter Assemblierungsfaktoren fällt auf, dass viele sowohl eine Rolle in der PSII-Biogenese, als auch in der PSII-Reparatur spielen (Abb. 1.2). Vermutlich trifft diese doppelte Funktionalität auch auf den OHP-HCF244-Komplex zu, da die Beladung von pD1 mit Pigmenten sowohl in der PSII-Biogenese als auch im Reparaturzyklus stattfinden muss, und die parallele Existenz eines weiteren Versorgungsweges für pD1 unwahrscheinlich ist.

OHP1, OHP2 und HCF244 besitzen differentielle Funktionen im heterotrimeren OHP-HCF244-Komplex Während die Funktion der OHPs innerhalb des heterotrimeren Komplexes relativ klar erscheint, und wie beschrieben vermutlich wenigstens in der Pigmentbindung, der Chl-Weitergabe an pD1, möglicherweise der Dissipation von Anregungsenergie und der Stabilisierung von HCF244 durch dessen Membranassoziation besteht, ist die exakte molekulare Funktion von HCF244 weniger eindeutig. Aufgrund der Zugehörigkeit von HCF244 zu den atypischen SDR-Proteinen und dem damit einhergehenden Verlust der Aminosäuren in der SDR-typischen katalytischen Tetrade ist eine enzymatische Aktivität von HCF244 unwahrscheinlich. Atypische SDR-Proteine haben die katalytische Aktivität wahrscheinlich generell verloren (LINK *et al.* 2012). Die Mutation von drei der vier die ursprüngliche katalytische Tetrade in SDRs bildenden Aminosäuren in HCF244 zu Alanin (HCF244^{mut}-C-Linien) hatte jedoch trotzdem Einfluss auf die Funktionalität des Proteins (HEY *et al.* 2018a, Fig. 8): Wenngleich Kontroll-ähnliche Mengen (im Vergleich zur HCF244-C-Linie) der OHPs und des mutierten HCF244-Proteins akkumulierten, verhielt sich die D1-Synthese wie in *hcf244*. Angesichts der zielgerichteten Mutationen ist eine strukturelle Beeinträchtigung des entsprechend mutierten HCF244-Proteins jedoch unwahrscheinlich.

SDR-Proteine können aufgrund ihrer Rossmann-Faltung redoxaktive Cofaktoren (FAD, NAD(H) oder NADP(H)) binden. Eine Vorhersage über den Cofactory-Server (GEERTZ-HANSEN *et al.* 2014) ergab eine hohe theoretische Spezifität von HCF244 gegenüber NADP(H). Nichtsdestotrotz bleibt eine Cofaktor-Bindung von HCF244 spekulativ, besonders angesichts der Tatsache, dass die Aufreinigung rekombinant exprimierter HCF244-Proteine infolge deren Unlöslichkeit nicht möglich war, und daher eine ausführliche Bindungsanalyse nicht durchgeführt werden konnte. Aufgrund der strukturellen Ableitung von FAD bzw. NAD(P) von Nukleotiden, und der Beobachtung, dass einzelne α SDR-Proteine eine Rolle im RNA-Metabolismus übernommen haben (PERSSON *et al.* 2009), ließ sich über eine RNA-Bindeeigenschaft von HCF244 spekulieren. LINK *et al.* (2012) fanden jedoch keine Belege für eine solche Bindeeigenschaft. Dies steht im Gegensatz zu HCF173, welches Teil eines hochmolekularen, *psbA*-bindenden Komplexes ist (SCHULT *et al.* 2007; LINK *et al.* 2012; JIN *et al.* 2018). HCF244 wurde wie OHP1 und OHP2 in Abwesenheit von HCF173 nicht destabilisiert (LI *et al.* 2018; HEY *et al.* 2018a, Suppl. Fig. 7D), und die *hcf244/hcf173*-Doppelmutante zeigte additive Effekte (LINK *et al.* 2012; HEY *et al.* 2018a, Suppl. Fig. 7A-D). Ebenso war HCF173 in *ohp1*, *ohp2* und *hcf244* weitestgehend stabil (LI *et al.* 2018). Diese Ergebnisse sprechen für eine funktionelle Unabhängigkeit von HCF244 und HCF173, entgegen der von MYOUGA *et al.* (2018) postulierten Assoziation von HCF173 mit den OHPs. In der vorliegenden Arbeit konnte auch zumindest mittels BiFC (im Gegensatz zur eindeutigen OHP2-HCF244-Interaktion) keine Interaktion der OHPs mit HCF173 nachgewiesen werden (HEY *et al.* 2018a, Fig. 1B). HCF173 funktioniert wahrscheinlich im Komplex mit LPE1 (JIN *et al.* 2018) (Abb. 4.2 B).

Die exakte molekulare Funktion von HCF244 in der D1-Synthese (abgesehen von der Stabilisierung des OHP-Heterodimers) bleibt angesichts der oben dargelegten Erkenntnisse weiterhin eine offene Fragestellung. Eine punktuell mutierte und daher disfunktionale HCF244-Variante (HCF244^{mut}) konnte trotz Stabilisierung der OHPs nicht die *hcf244*-Mutante komplementieren. Die Funktion von HCF244 umfasst daher mit Sicherheit mehr als eine reine Scaffold-Funktion. Der Zustand in den HCF244^{mut}-C-Linien entsprach formal einer Abwesenheit der HCF244-Funktion in Anwesenheit der OHPs. Der umgekehrte Fall, d.h. die Anwesenheit von HCF244 in Abwesenheit der OHPs

konnte aufgrund des obligatorischen stabilisierenden Einflusses von OHP2 auf HCF244 nur mittels der Expression der membrangebundenen HCF244-TMH_{tAPX}-Variante im *ohp2*-Hintergrund erreicht werden (Abb. 3.21). Das Fusionsprotein akkumulierte in annähernd WT-ähnlichen Mengen, konnte aber nur zu einer schwachen, partiellen makroskopischen Komplementation des *ohp2*-Phänotyps beitragen. Da die HCF244-TMH_{tAPX}-Variante zur Komplementation von *hcf244* in der Lage war (Abb. 3.22), kann eine Inaktivität des Fusionsproteins als Begründung für die fehlende Komplementationsfähigkeit von *ohp2* ausgeschlossen werden. D1 akkumulierte bei Expression der HCF244-TMH_{tAPX}-Variante im *ohp2*-Hintergrund nicht stärker als in *ohp2* (Abb. 3.21 C). Trotz des fehlenden Wissens über die exakte Funktion von HCF244 ist dies unmittelbar verständlich, da die Beladung von pD1 mit Pigmenten über das OHP-Dimer erfolgen muss, dessen Funktion nicht umgangen werden kann. Konsequenterweise akkumulierte auch in den *ohp2*/HCF244-TMH_{tAPX}-Linien wie in *ohp2* kein OHP1, was wiederum die Notwendigkeit des Vorliegens von sowohl OHP2 als auch HCF244 zur Stabilisierung von OHP1 unterstreicht.

Die Interaktion von OHP2 mit HCF244 geschieht über den M-Teil von OHP2 (HEY *et al.* 2018a, Fig. 1B, C; Abb. 1.5 A), und die Deletion dieses Proteinabschnitts verhinderte erwartungsgemäß die Stabilisierung von HCF244 (und damit auch die Stabilisierung von OHP1), was zum Verlust der Komplementationsfähigkeit des OHP2-ΔM-Konstrukts in der *ohp2*-Mutante führte (Abb. 3.15). Die entsprechenden Linien zeigten lediglich eine partielle Komplementation des makroskopischen Phänotyps, der sich aber in den Analysen auf molekularer Ebene nicht widerspiegelte (Abb. 3.15 A,D,F). Kontrollkonstrukte mit Deletion des OHP2-C-Terminus (OHP2-ΔC) konnten erwartungsgemäß ebenfalls nicht *ohp2* komplementieren, während ein um den Prolin-reichen Abschnitt verkürztes Protein (OHP2-ΔProRS) wenigstens unter Normalbedingungen eine uneingeschränkte Komplementation erlaubte (Abb. 3.15). Angesichts der Funktion der OHPs in der D1-Biogenese, der nachgewiesenen funktionellen Verbindung der Hlips zum Ribosom innerhalb des Hlip-Ycf39-ChlG-Komplexes sowie der Beobachtung, dass das plastidäre Ribosom mit RPL24 ein strukturell für eine OHP2-Ribosomen-Interaktion günstig gelegenes SH3-Domänenprotein besitzt (mit der SH3-Domäne als mögliche Interaktionsstelle zu Prolin-reichen Peptidliganden), wurde für OHP2 eine Interaktion zum plastidären Ribosom postuliert. *In vitro*-Studien konnten diese Arbeitshypothese jedoch nicht bestätigen (Abb. 3.26), sodass die mit Sicherheit über den ProRS-Teil von OHP2 stattfindende Interaktion zu anderen Bindungspartnern nicht aufgeklärt werden konnte. Die potentiellen Interaktionen des ProRS-Teils scheinen aber im Gegensatz zur OHP2-HCF244-Interaktion nicht essentiell zu sein (Abb. 3.15, 4.2 B).

4.3 OHP1 ist von besonderer Relevanz unter Lichtstressbedingungen sowie in frühen Entwicklungsstadien

Der Verlust von OHP1 vermindert die Toleranz gegenüber Lichtstress Die D1-Syntheserate in VIGS-OHP1 war vermindert, auch wenn dies unter Normalbedingungen keinen Einfluss auf das Pflanzenwachstum hatte und der *Steady State*-Gehalt von D1 letztlich dem der VIGS-GFP-Kontrolle entsprach (HEY *et al.* 2018a, Fig. 2A, 4A, 5B, C). Dessen ungeachtet war zu erwarten, dass sich die funktionelle Beeinträchtigung der D1-Synthese unter Lichtstress, d.h. unter Bedingungen erhöhten PSII-Umsatzes, spürbar auf den D1-Gehalt auswirken sollte. Die Exposition von

VIGS-OHP1 gegenüber Starklicht ($850\mu\text{mol Photonen s}^{-1}\text{ m}^{-2}$) zeigte dann auch genau diesen Effekt: Chl-fluorometrische Analysen ergaben, dass der F_v/F_m -Wert in VIGS-OHP1 im Starklicht deutlich schneller und drastischer sank als in der VIGS-GFP-Kontrolle, wenngleich beide Linien im Ausgangszustand ähnliche F_v/F_m -Werte aufwiesen (HEY *et al.* 2018b, Fig. 1A, B). F_v/F_m bezeichnet die maximale Quantenausbeute von PSII und kann als genereller Indikator für das Stresslevel von Pflanzen herangezogen werden, wobei im Zuge einer Stressexposition sinkende Werte beobachtet werden (MURCHIE *et al.* 2013). Der Grund für das Absinken liegt in der Photoschädigung der D1-Untereinheit (Photoinhibition) bzw. der Induktion des NPQ. Im Gegensatz zum Zustand vor der Stressexposition mit gleichen D1-Gehalten in VIGS-GFP und VIGS-OHP1 war bereits nach sechs Stunden Starklicht eine signifikante Verringerung von D1 in VIGS-OHP1 detektierbar (HEY *et al.* 2018b, Fig. 1C). Dies lässt sich direkt auf die verringerte D1-Syntheserate zurückführen und unterstreicht die Notwendigkeit der Assoziation von OHP1 zum OHP2-HCF244-Komplex, um diesem die volle Aktivität zu verleihen. In adulten Pflanzen scheint die volle Aktivität insbesondere unter Stressbedingungen notwendig zu sein, während unter Normalbedingungen (d.h. unter kontrollierten Wachstumsbedingungen) die Aktivität des OHP2-HCF244-Komplexes vollkommen ausreicht.

Konsequenterweise zeichneten sich auch die OHP1-RNAi-Linien durch eine größere Anfälligkeit gegenüber erhöhten Lichtintensitäten im Vergleich zum WT aus (Abb. 3.13): Die Starklichtexposition sowohl der phänotypisch auffälligen Linie #11, als auch der Linie #44 mit mildem Phänotyp führte zu einem fast vollständigen Verschwinden von D1 während der 24-stündigen Versuchsdauer, was sich ebenfalls in drastisch absinkenden F_v/F_m -Werten widerspiegelte. Das Fehlen von OHP1 vom Beginn der Entwicklung an scheint demnach zu einer deutlich höheren Photosensitivität von PSII bzw. der PSII-Assemblierung zu führen als das spätere Silencing durch den VIGS-Assay.

Eine OHP1-Überexpression bewirkt eine höhere Toleranz gegenüber Lichtstress Sollte OHP1 tatsächlich eine besondere Rolle bei erhöhten Lichtbedingungen spielen, so könnte man annehmen, dass die OHP1-Expression im Starklicht deutlich messbar ansteigt. Für die cyanobakteriellen Hlips wurde eine solche Lichtabhängigkeit der Expression beschrieben, und BECK *et al.* (2017) sowie MYOUGA *et al.* (2018) berichteten von einer Lichtintensität-abhängigen Expression bzw. Induktion der OHP-Expression im Starklicht. Dies war in der vorliegenden Arbeit jedoch nur in begrenztem Maße nachweisbar: Sowohl die Analyse der VIGS-Linien, als auch die Analyse von jüngeren WT-Pflanzen zeigte eine Zunahme der OHP-Transkripte auf maximal das Doppelte der Expression vor der Stressbehandlung (HEY *et al.* 2018b, Fig. 2; Abb. 3.12 A). Im Vergleich zum bekanntermaßen Starklicht-induzierten *ELIP1* mit einer mehr als 100-fachen Steigerung der mRNA-Menge erscheint die Zunahme von OHP1 marginal (HEY *et al.* 2018b, Fig. 2; Abb. 3.12 A). Die OHP1-Level stiegen auf maximal das 1,5-fache an, während die Level von OHP2 im Wesentlichen unverändert blieben (Abb. 3.12 B). Zudem zeigte auch eine längere Inkubation in Dunkelheit keinen signifikanten Effekt auf das OHP1-Proteinlevel (Abb. 3.3 B). Einerseits kann daher zusammengefasst kaum von einer lichtinduzierten OHP-Akkumulation gesprochen werden, andererseits scheinen die OHP-Proteinlevel grundsätzlich einer stringenten Kontrolle zu unterliegen (vgl. Abschnitt 4.5).

Die OHP1-OX- (und OHP2-OX)-Linien wiesen denn auch trotz stark erhöhter Transkriptmengen nur vergleichsweise schwach erhöhte OHP-Proteingehalte auf (Abb. 3.10 B,C). Während sich

die OHP2-OX-Linien im Starklicht (trotz grundsätzlich weniger stark als im WT absinkenden F_v/F_m -Werten) hinsichtlich der Reduktion des detektierbaren D1-Proteins nach 24 Stunden wie der entsprechende WT verhielten, zeigten die untersuchten OHP1-OX-Linien keine Abnahme von D1 (Abb. 3.13 C). Eine mögliche Erklärung für den besseren Umgang der OHP1-OX-Linien mit Starklicht könnte sein, dass OHP1 während der Aktion des OHP-HCF244-Heterotrimers photooxidativ geschädigt wird (ähnlich dem D1-Protein), und anschließend ersetzt werden muss. In den OHP1-OX-Linien wäre dann aufgrund der höheren Mengen an verfügbarem OHP1 dieser Ersatz schneller zu bewerkstelligen, sodass ein möglicher negativer Effekt des Fehlens von (funktionellem) OHP1-Protein ausbleibt. Die Hypothese einer Photoschädigung von OHP1 über gebundene Pigmente ist besonders attraktiv angesichts des Akkumulationsverhaltens der OHP1-AAA-Variante (s.u.).

Die Bedeutung von OHP1 in frühen Entwicklungsstadien beruht wahrscheinlich auf dessen Rolle beim Schutz vor Lichtstress In Bezug auf die Funktion von OHP1 bleibt die Diskrepanz zwischen dem Verhalten von *ohp1*/OHP1-RNAi einerseits und VIGS-OHP1 andererseits zu erörtern: Insbesondere die Unterschiede zwischen den konstruktionell gleichartigen OHP1-RNAi- und VIGS-OHP1-Linien sind auffällig (Abb. 3.9). Dass der einzige konzeptionelle Unterschied im späteren Einsetzen des Silencings in VIGS-OHP1 (Infiltration 12 Tage nach der Keimung) im Vergleich zum RNAi-Ansatz lag, weist auf eine essentielle Funktion von OHP1 in der frühen Keimlingsentwicklung hin, die durch das Vorhandensein von OHP2 nicht ausgeglichen werden kann. Schließt man eine Beteiligung der OHPs an der Etablierung der Thylakoidmembrantopologie und der grundlegenden Synthese der Membranstrukturen aus (die Chloroplasten von VIGS-OHP2 und OHP1-RNAi enthielten funktionelle Thylakoide), so bleibt als eine mögliche Erklärung der Schutz vor Lichtstress (HEY *et al.* 2018b): Frühe Entwicklungsstadien repräsentieren wahrscheinlich einen photosensitiven Zustand, in welchem die Synthese der photosynthetischen Komplexe in großer Menge und womöglich weitestgehend ungeschützt abläuft. Hierbei könnte eine Energiedissipation über das OHP-Heterodimer einen entscheidenden Anteil am Schutz vor Lichtschädigung haben. Warum das letztendlich synthetisierte D1 in den OHP1-RNAi-Linien stärker photosensitiv ist, müsste Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Momentan liegen aber keine Ergebnisse vor, welche die Annahme rechtfertigen, dass die OHPs Teil der assemblierten PSII-Komplexe (PSII-Dimer bzw. PSII-LHCII-Superkomplexe) sind, und somit an der Photoprotektion von reifem PSII beteiligt sein könnten (vgl. HEY *et al.* 2018a, Fig. 1F). Gegen eine spezielle Funktion der OHPs im Proplastiden/Etioplasten spricht zudem die Beobachtung, dass die Proteingehalte beider OHPs während der Deetiolierung stark ansteigen, d.h. eher mit dem differenzierenden Chloroplasten korrelieren.

4.4 Das OHP1-OHP2-Heterodimer bindet Chlorophyll über die konservierten Aminosäuren des Chlorophyllbindemotivs

Die Chlorophyllbindung basiert auf der Bildung des OHP1-OHP2-Heterodimers sowie den konservierten Aminosäuren Zur Charakterisierung der Pigmentbindeeigenschaften der OHPs wurde ein *in vitro*-Rekonstitutionsansatz genutzt, der für LHCII in früheren Arbeiten (NATALI

et al. 2014) sowie in dieser Arbeit erfolgreich angewandt werden konnte: Auf CN-Gelen waren pigmentierte Komplexe sichtbar und die Stöchiometrie der enthaltenen Pigmente entsprach der des nativen LHCII (Abb. 3.24, Tab. 3.1). Während monomere LHCPs aufgrund ihrer Primärstruktur bereits zur (für die Pigmentbindung wichtigen) intramolekularen Bildung eines LHC-Helixpaares in der Lage sind, wurde hinsichtlich der OHPs eine Heterodimerisierung als essentielle Voraussetzung für die Pigmentbindung vermutet. Diese Hypothese konnte experimentell bestätigt werden, da die Rekonstitution mit den Einzelproteinen gegenüber dem stark gefärbten OHP1-WT/OHP2-WT-Ansatz nur schwach gefärbte Eluate ergab (Abb. 3.24 A-C,G). Diese trennten sich zudem in CN-Gelen nicht in pigmentierte Banden auf (Abb. 3.25 A). Insgesamt stützen diese Ergebnisse die Idee der ausschließlichen OHP-Heterodimerisierung. Selbst wenn die theoretische Bildung von Homodimeren (bzw. Oligomeren) in den Einzel-Rekonstitutionsansätzen nicht ausgeschlossen werden kann, ist offensichtlich, dass diese nicht zur Bindung von Pigmenten in der Lage sind. Insofern unterscheiden sich die OHPs auch von dem potentiell zur Bildung von pigmentbindenden Homodi- und Homooligomeren fähigen HliC-Protein (SHUKLA *et al.* 2018).

Der nachfolgende Schritt in der Charakterisierung der Pigmentbindung war die Verwendung der AAA-Proteinvarianten in Form der beiden möglichen OHP-WT/AAA-Kombinationen. Auch diese Rekonstitutionen ergaben wie die Einzelansätze nur schwach pigmentierte Eluate, ohne in CN-Gelen sichtbare, pigmentierte Komplexe zu zeigen (Abb. 3.24 D-F,H; 3.25 B). Die in den LHCPs an der Chl-Bindung beteiligten, konservierten Aminosäuren können entsprechend für die OHPs als essentiell angesehen werden. Es ist wahrscheinlich, dass die konservierten Aminosäuren generell bei allen Proteinen der LHC-Familie essentiell sind, auch wenn sie wie im Fall des (grundsätzlich nicht-pigmentbindenden) PsbS-Proteins bzw. im Fall von LIL3 (s.u.) nicht zwangsläufig mit der Pigmentbindung im Zusammenhang stehen müssen. Auch muss die Pigmentbindung nicht in allen Fällen essentiell für die Proteinfunktion sein. Für die anderen Proteine der LHC-Familie müssten jedoch zur Bestätigung dieser Hypothese entsprechende Untersuchungen z. B. mit Komplementationskonstrukten durchgeführt werden. Es sollte hervorgehoben werden, dass der Austausch der drei konservierten Aminosäuren in den OHP-AAA-Varianten nicht deren Fähigkeit zur Interaktion mit der jeweils anderen WT-Variante beeinträchtigte (Abb. 3.18 A, 3.20 A). Die Heterodimerisierung ist daher von der Chl-Bindung unabhängig. Zudem lässt sich die ausbleibende Pigmentbindung in den WT/AAA-Kombinationsansätzen nicht durch eine fehlende Heterodimerisierung erklären. Auch die Interaktion von OHP2-AAA mit HCF244 war erwartungsgemäß nicht grundsätzlich gestört (Abb. 3.20 B).

Aufgrund des erwartbar hohen Anteils an nicht-pigmentbindenden OHP-Proteinen im WT/WT-Rekonstitutionsansatz wurden die extrahierten Pigmente auf sechs Chl a-Moleküle normiert (Tab. 3.2), insbesondere um die Werte mit den für die Hlips experimentell bestimmten Werten vergleichen zu können. Dabei zeigte sich, dass relativ zu den sechs Molekülen Chl a ein Chl b und zwei Carotinoide (β -Car sowie Lutein in äquimolarem Verhältnis) gebunden waren. Dies traf mit großer Übereinstimmung für drei unabhängige Rekonstitutionsansätze zu (Tab. 3.2). Eine Sinnhaftigkeit dieser Art von Normierung ergibt sich im Übrigen aus der Beobachtung, dass sich nur bei Normierung auf sechs Chl a-Moleküle ganze Zahlen auch für die anderen Pigmente erhalten ließen. Für β -Car wurde eine starke Anreicherung im WT/WT-Ansatz im Vergleich zur eingesetzten Pigmentlösung beobachtet, während Neo- sowie Violaxanthin vollständig abgereichert

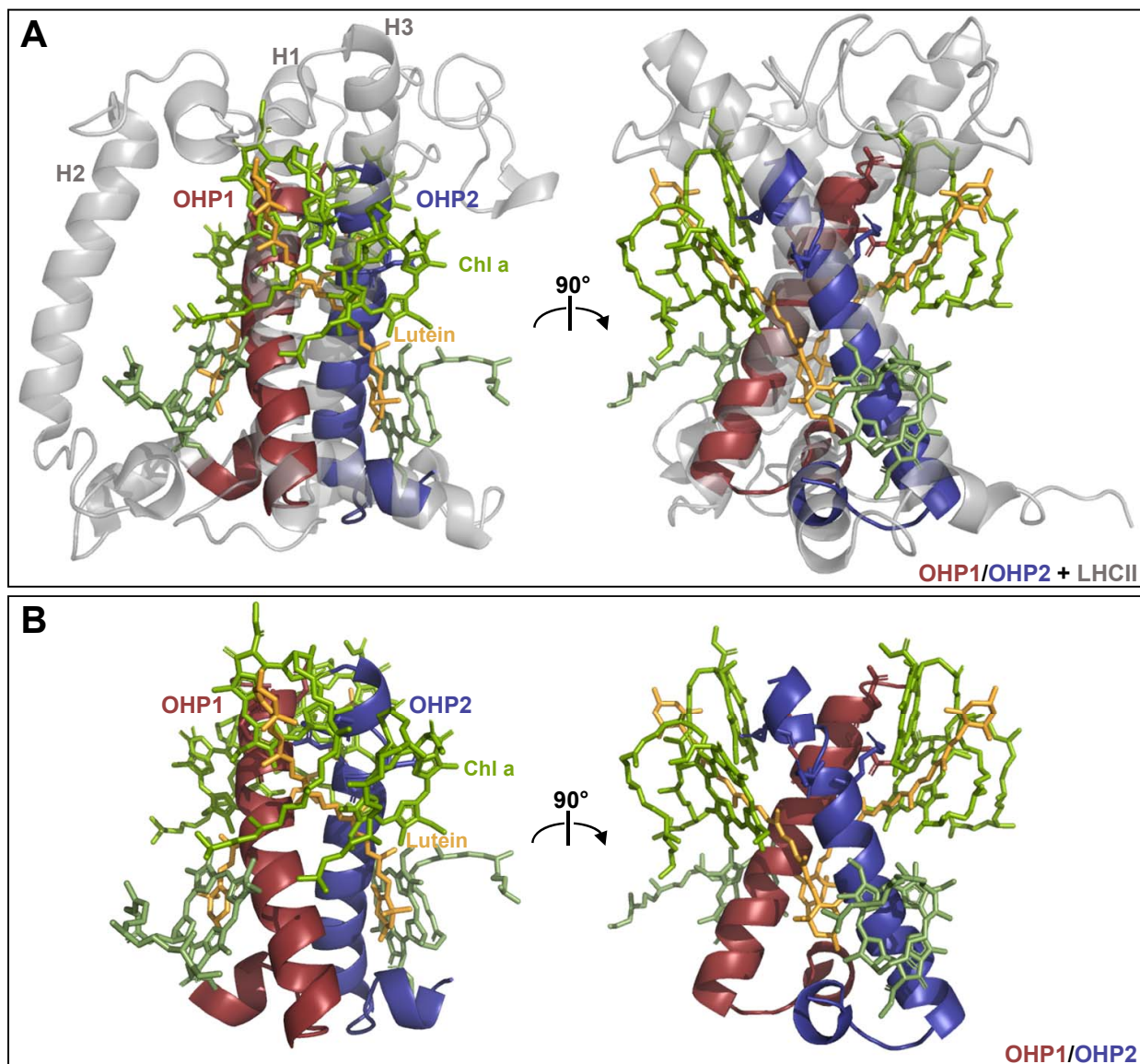


Abbildung 4.3: Modell der Pigmentbindung an das OHP1-OHP2-Heterodimer. Die Strukturen der C-terminalen Abschnitte beider OHPs (OHP1: Aminosäuren 66-110, OHP2: Aminosäuren 127-172) wurden durch den Phyre²-Server modelliert (KELLEY *et al.* 2015) und anschließend in PyMOL mit Helix 1 (OHP1, rot) bzw. Helix 3 (OHP2, blau) eines LHCII-Monomers aus der LHCII-Kristallstruktur (PDB-Eintrag 1rwt, LIU *et al.* 2004) überlagert. A, Überlagerung der drei Strukturen. Zusätzlich sind zwei Lutein- (orange) und sechs Chl a-Moleküle (grün) aus der LHCII-Kristallstruktur sind dargestellt. B, Alleinige Darstellung der OHPs sowie der ausgewählten Pigmentmoleküle.

wurden (Tab. 3.2). Interessant ist die Beobachtung, dass das OHP1-WT/OHP2-WT-Dimer gleiche Stöchiometrien an Chl a (sechs) zu Carotinoiden (zwei) wie das HliC/HliD-Dimer binden konnte (STALEVA *et al.* 2015). Dies spricht dafür, dass die Pigmentbindung in beiden Fällen vermutlich sehr ähnlich aussieht.

Durch Überlagerung der mittels des Phyre²-Servers modellierten Strukturen der OHP-C-Termini mit der Kristallstruktur eines LHCII-Monomers lässt sich ein Eindruck von der möglichen Assoziation der OHP-Varianten miteinander und der Pigmentbindung des OHP1-OHP2-Heterodimers gewinnen (Abb. 4.3). Auffällig ist, dass die TMHs der OHP-Varianten am N-terminalen Ende deutlich kürzer sind als die Helices 1 und 3 von LHCII (Abb. 4.3 A). Dies könnte aber auch auf eine fehlerbehaftete Vorhersage der OHP-Sekundärstruktur zurückzuführen sein: Die Mo-

dellierung wurde drei Aminosäurepositionen vor den konservierten Aminosäuren begonnen, da Sekundärstruktur-Vorhersagetoools wie JPred4 (DROZDETSKIY *et al.* 2015) einen Beginn der Helix frühestens an dieser Stelle vorhersagten. In jedem Fall lassen sich sechs Chl a-Moleküle und zwei Carotinoide entsprechend der LHCII-Kristallstruktur so um die beiden OHP-Helices anordnen (Abb. 4.3 B), dass alle Chl-Moleküle in Kontakt zu den Proteinen stehen. Die vier am N-terminalen Ende der Helices gebundenen Chl-Moleküle interagieren mit den konservierten Aminosäuren (vgl. Abschnitt 1.3.4).

Obwohl die konservierten Aminosäuren in LHCII nachweislich spezifisch an der Koordination von Chl-Molekülen, nicht aber an der Bindung von Carotinoiden beteiligt sind (LIU *et al.* 2004), verhinderte der Austausch der entsprechenden Aminosäuren in den OHPs nicht nur die Bindung von Chl, sondern auch die von Carotinoiden. Andernfalls wäre eine im Vergleich zu den Chl-Mengen signifikante Akkumulation der Carotinoide zu erwarten gewesen. Dies war aber nicht der Fall (Tab. 3.2). Das bedeutet, dass für die Carotinoidbindung die Interaktion zu den Chl-Molekülen essentiell sein muss. In der Tat ergab eine Analyse der LHCII-Kristallstruktur (PDB-Eintrag 1rwt), dass die Carotinoide neben Kontakten zu Aminosäuren (ausschließlich außerhalb des konservierten Motivs) vor allem Kontakte zu Chl-Molekülen aufwiesen. Die spektroskopische Analyse des OHP1-WT/OHP2-WT-Komplexes zeigte, dass in begrenztem Maße Energietransfer von Chl b auf Chl a, sowie von den Carotinoiden auf sowohl Chl a als auch Chl b stattfand (Abb. 3.25 C-F). Im Vergleich zum wie erwartet vollständigen Energietransfer von Chl b zu Chl a in LHCII (Abb. 3.23 D) war der Energietransfer im OHP-Komplex aber nur partiell. Ob eine solche Energieübertragung *in vivo* zweckmäßig ist, sowie ob Chl b tatsächlich fester Bestandteil des nativen OHP-Komplexes ist, müsste durch weitergehende Aufreinigung und Charakterisierung des Komplexes untersucht werden.

Die konservierten Aminosäuren im Chlorophyllbindemotiv sind unabdingbar für die biologische Funktion von OHP1 und OHP2 Falls die Fähigkeit des OHP-Heterodimers zur Pigmentbindung essentiell für dessen biologische Funktion ist, sollte eine Komplementation der *ohp*-Mutanten mit den OHP-AAA-Varianten aufgrund des Funktionsverlusts nicht möglich sein. Im Fall von OHP1-AAA konnte erwartungsgemäß nicht einmal eine partielle Komplementation von *ohp1* beobachtet werden, obwohl die mutierte Proteinvariante überakkumulierte (Abb. 3.16 A,C). Die OHP2-AAA-Linien im *ohp2*-Hintergrund dagegen zeigten eine partielle Komplementation des Mutantenphänotyps (Abb. 3.19 A,C). Interessanterweise scheinen daher die konservierten Aminosäuren des Chl-Bindemotivs in OHP1 aus bisher unklaren Gründen wichtiger für die Funktion des OHP-Heterodimers zu sein. Möglicherweise hängt dies mit der vermuteten essentiellen Funktion von OHP1 in frühen Entwicklungsstadien zusammen (s.o.): In den *ohp2*/OHP2-AAA-Linien lag (im Gegensatz zu den *ohp1*/OHP1-AAA-Linien) die aktive WT-OHP1-Variante vor. Die Existenz der OHP1-Funktion in den frühen Entwicklungsstadien der *ohp2*/OHP2-AAA-Linien kann daher angenommen werden, was die gegenüber den OHP1-AAA-Linien bessere Komplementationsfähigkeit erklären könnte. Schlussendlich lässt sich anhand der oben gezeigten Ergebnisse auch die verringerte Aktivität des OHP2-HCF244-Komplexes in den VIGS-OHP1-Linien durch das Unvermögen des isolierten OHP2-Proteins zur Pigmentbindung erklären. Möglicherweise kann OHP2 in VIGS-OHP1 jedoch trotzdem eine (für einen ineffizienten Chl-Transfer an pD1 ausreichende) transiente Interaktion zu Chl aufnehmen.

LI *et al.* (2018) identifizierten die identischen konservierten Aminosäuren im Chl-Bindemotiv der OHPs, nutzten aber nur Konstrukte mit einer gleichzeitigen Mutation der ersten beiden Aminosäuren (ExxNxR), sowie einer alleinigen Mutation der dritten (ExxNxR) zur Komplementation der *ohp*-Mutanten. Die entsprechenden Linien waren phänotypisch unauffällig, zeigten aber einen verringerten F_v/F_m -Wert. Während niedrigere Gehalte der jeweils anderen OHP-Variante in den von LI *et al.* (2018) beschriebenen Komplementationslinien angesichts der oben gezeigten Ergebnisse überraschend und inkonsistent sind, und nur durch nicht-WT-artige Gehalte der mutierten OHP-Variante erklärt werden können, entsprechen niedrigere Mengen von D1 der Erwartung, wenn man eine Beteiligung der konservierten Aminosäuren an der Chl-Bindung und Weiterleitung annimmt. Zusammengenommen lässt sich aus den gezeigten Ergebnissen ableiten, dass alle drei konservierten Aminosäuren im Chl-Bindemotiv für die Funktion beider OHPs von Relevanz sind.

4.5 Die OHPs unterliegen einer posttranslationalen Kontrolle

Die Proteinlevel der OHPs sind strikt kontrolliert Verschiedene Beobachtungen stützen die Hypothese, dass die Proteingehalte beider OHPs stringent kontrolliert werden: So entsprach die Zunahme der Proteinmenge in den OHP-OX-Linien nicht der Akkumulation der entsprechenden Transkripte (Abb. 3.10 B,C). Ferner bewirkte die Überexpression der HA-StrepII-getaggten OHP-Varianten sogar nur eine Akkumulation der Fusionsproteine in Höhe von maximal 20% der WT-Proteine (HEY *et al.* 2018a, Suppl. Fig. 1, 2). Bei der Expression der WT-Überexpressionskonstrukte (ohne Tag) im entsprechenden *ohp*-Hintergrund erreichten die OHP-Proteinmengen wiederum maximal das WT-Level (Abb. 3.16 C, 3.19 C). Die entscheidende Ausnahme stellten die OHP1-AAA-Komplementationslinien dar, bei denen eine mit den WT-Konstrukten vergleichbare Expression zu deutlich erhöhten Proteinmengen der OHP1-AAA-Variante führte (Abb. 3.16 C). Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich folgende Hypothesen zur Kontrolle der Proteinlevel aufstellen: Zum einen geschieht die Kontrolle posttranslational, vermutlich durch eine proteolytische Aktivität im Chloroplasten. Signifikante Veränderungen in der OHP-Primärstruktur wie das Anhängen des HA-StrepII-Tags (sowie in gewissem Grad auch die Expression der verkürzten OHP2-Varianten) scheinen die entsprechenden Proteine besonders instabil zu machen. OHP1 (und HCF244) erwies(en) sich wie oben dargelegt als besonders anfällig gegenüber dem proteolytischen Abbau, was sich insbesondere in Abwesenheit von OHP2 deutlich zeigte. Die Bindung von OHP1 an OHP2 scheint OHP1 daher vor Degradation zu bewahren. Es bleibt jedoch offen, ob die Degradation von OHP1 in Abwesenheit von OHP2 ein gezielter (bzw. notwendiger) Effekt oder eine unspezifische (d.h. ungewünschte) Nebenwirkung der OHP2-Abwesenheit ist. Ein negativer Einfluss frei vorliegender OHP1-(WT)-Proteine lässt sich aus den erhobenen Daten nicht unmittelbar ableiten. Allerdings konnte in keiner der untersuchten Linien OHP1 alleine stabilisiert werden, wodurch die Auswirkungen frei vorliegender OHP1-Proteine nicht untersucht werden konnten.

Ein wichtiger Schritt in der funktionellen Charakterisierung der OHPs wäre die Identifikation der für die Degradation von OHP1 zuständigen Protease. Der experimentelle Ansatz hierfür wurde als *Proof of Concept* angedeutet, und kann in Form einer VIGS-vermittelten Inaktivierung von *OHP2* im Hintergrund von Proteasemutanten bzw. in Form einer VIGS-abhängigen Co-Inaktivierung von *OHP2* und entsprechenden Protease-Genen (insbesondere im Fall von Protease-Genen, deren

Inaktivierung zu drastischen Mutantenphänotypen führt) ausgeführt werden. Dabei muss beachtet werden, dass die Protease-Mutanten in der Regel wachstumsverzögert sind und daher früher als der WT ausgesät werden müssen, um im gleichen Wachstumsstadium mit den VIGS-Konstrukten infiziert werden zu können. Die hier verwendeten Protease-Mutanten waren *clpC1*, neben ClpC2 und ClpD eines der Substrat-erkennenden Chaperone des Clp-Komplexes (OLINARES *et al.* 2011), sowie *ftsH2*, die abundanteste Untereinheit des FtsH-Komplexes (KATO *et al.* 2018). Die Inaktivierung von OHP2 in *clpC1* bzw. *ftsH2* hatte den gleichen destabilisierenden Effekt auf OHP1 wie im WT-Hintergrund (Abb. 3.12). Die Erkennung von OHP1 als Substrat für den Stroma-lokalisierten, löslichen Clp-Komplex durch ClpC1 sowie für den Thylakoid-gebundenen FtsH-Komplex durch FtsH2 scheint daher unwahrscheinlich. Da aber in beiden Komplexen weitere Untereinheiten an der Substraterkennung beteiligt sind, kann weder das Clp-System, noch FtsH endgültig als zuständige Protease ausgeschlossen werden. Eine interessante Beobachtung ist zudem, dass die *clpC1*/VIGS-OHP2 und *ftsH2*/VIGS-OHP2-Linien im Gegensatz zur Col-0/VIGS-OHP2-Kontrolle keinen additiven makroskopischen Phänotyp zeigten (Abb. 3.7 A). *clpC1*-Mutanten besitzen niedrigere Gehalte von Untereinheiten beider Photosysteme (SJÖGREN *et al.* 2004), während FtsH2 für die Chloroplastenentwicklung und den effizienten Abbau von D1 im PSII-Reparaturmechanismus wichtig ist (KATO *et al.* 2012). Die Verbindung von ClpC1 und FtsH2 zur Etablierung und Aufrechterhaltung der PSII-Funktion wirkt sich daher vermutlich in Abwesenheit von OHP2, d.h. vor dem Hintergrund einer sowieso schon beeinträchtigten PSII-Synthese, schwächer aus als im WT.

Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit dem proteolytischen Abbau von OHP1 war die Beobachtung, dass die Überexpression der OHP1-AAA-Variante im *ohp1*-Hintergrund (bei gleich hohen OHP1-Leveln wie die Überexpression des OHP1-WT-Konstrukts) zu einer signifikanten Überakkumulation des Proteins führte (Abb. 3.16 C). Das Protein war darüber hinaus selbst in Abwesenheit von OHP2 (d.h. VIGS-OHP2) in WT-OHP1-Mengen stabil (Abb. 3.18 B,C). Hieraus lassen sich zwei mögliche Funktions- bzw. Regulationsmechanismen ableiten: (i) Einerseits wäre es denkbar, dass die für den Abbau von OHP1 zuständige Protease das Chl-Bindemotiv als Erkennungsstelle benötigt. Dann könnte möglicherweise ein für die Proteine der LHC-Familie spezifischer Degradationsmechanismus vorliegen. Einschränkend muss allerdings angemerkt werden, dass der Effekt in den OHP2-AAA-Linien nicht auftrat, d.h. nur maximal WT-OHP2-Mengen nachweisbar waren (Abb. 3.19 C). Eine erhöhte Stabilität der OHP2-AAA-Variante ist spekulativ, da keine Bedingung existiert, unter welcher OHP2 selektiv (d.h. ohne Beeinträchtigung von OHP1 und HCF244) destabilisiert werden kann. Als einzige spezifisch für den Abbau von Proteinen der LHC-Familie zuständige Protease wurde bisher FtsH6 beschrieben (Abbau von LHCB1 und LHCB3 unter Starklicht) (ZELISKO *et al.* 2005, Fig. 4). Die gezeigten Daten waren allerdings wenig überzeugend und konnten später *in planta* nicht bestätigt werden (WAGNER *et al.* 2011). (ii) Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass OHP1 während der Ausübung seiner Aktivität durch gebundene Pigmente photooxidativ geschädigt wird, daraufhin seine Funktion verliert und abgebaut bzw. ersetzt werden muss. Da das OHP1-AAA/OHP2-WT-Heterodimer nachgewiesenermaßen nicht zur Pigmentbindung fähig war (Abb. 3.24 D-F, 3.25 B), würde in den OHP1-AAA-Linien die Photoschädigung ausbleiben, was OHP1-AAA eine höhere Stabilität verleihen, und damit die beobachtete Akkumulation ermöglichen würde.

OHP1 kann Disulfidbrücken zu anderen Proteinen ausbilden OHP1 verfügt über ein (innerhalb der pflanzlichen OHP1-Proteine) konserviertes Cystein an Position 76, das in der TMH direkt nach den konservierten Aminosäuren des Chl-Bindemotivs lokalisiert ist (Abb. 3.1 A). *In vitro* konnte rekombinant exprimiertes OHP1-Protein über dieses Cystein DTT-sensitive Homodimere ausbilden, wobei die Fähigkeit zur redoxabhängigen Dimerisierung bei Mutation des Cysteins erwartungsgemäß verschwand (Abb. 3.1 B). Die Analyse von Proteinextrakten aus Thylakoidmembranen unter nichtreduzierenden Bedingungen erbrachte allerdings keine Hinweise auf eine physiologische Relevanz der OHP1-Homodimere, was angesichts der oben beschriebenen, ausschließlichen Bildung von OHP1-OHP2-Heterodimeren auch nicht verwundert: Banden von der erwarteten Größe des OHP1-Homodimers konnten lediglich durch Inkubation mit dem Oxidationsmittel Diamid erzeugt werden, und waren in unbehandelten Membranen nicht nachweisbar (Abb. 3.1 C, 3.3 A). Die Expression einer OHP1-C76A-Variante führte zur vollständigen phänotypischen Komplementation des *ohp1*-Mutantenphänotyps (Abb. 3.2). Interessant war dabei allerdings, dass die Komplementation schon mit 50% der WT-Menge des mutierten Proteins erreicht werden konnte. Die *in planta* vorliegende Menge an OHP1 scheint möglicherweise höher als der tatsächliche Bedarf zu sein.

Durch *in vitro*-Analysen der OHP1-VIGS-Linien sowie der C76A-Komplementationslinien konnten redoxsensitive OHP1-Addukte (bei etwa 30kDa bzw. im Bereich von 50-100kDa) identifiziert werden (Abb. 3.1 C, 3.3 A), die insgesamt allerdings nur einen Bruchteil des gesamten OHP1-Proteins repräsentierten. Da sich der Redoxzustand des Chloroplasten zwischen Licht und Dunkelheit unterscheidet, wurde die Akkumulation dieser Addukte nach Starklicht-Inkubation bzw. einer längeren Dunkelperiode (jeweils 18 Stunden) untersucht. Dabei ergaben sich keine Unterschiede in der Menge der Addukte (Abb. 3.3 B,C), was deren physiologische Relevanz (zumindest im Hinblick auf wechselnde Lichtbedingungen) gering erscheinen lässt. In Anbetracht der uneingeschränkten Komplementationsfähigkeit des C76A-Konstrukts (wenigstens unter Standardbedingungen) scheinen die Addukte auch nicht essentiell für die Funktion von OHP1 zu sein. Trotz der ausbleibenden Veränderung der OHP1-Adduktlevel könnte eine Anzucht der OHP1-C76A-Linien unter Stressbedingungen hilfreich für die Beantwortung der Fragestellung sein, inwieweit das redoxaktive Cystein eine spezifische biologische Relevanz besitzt.

OHP2 wird an mindestens zwei Positionen phosphoryliert OHP2 besitzt ein Serin an Position 54 (d.h. am Beginn des Pro-reichen Sequenzabschnitts), das in Hochdurchsatzexperimenten als Ziel einer Phosphorylierung identifiziert wurde. Dieses Serin ist in OHP2-Proteinen verschiedener Pflanzenspezies jedoch nicht konserviert (Abb. 1.5 B). Die Analyse von rekombinant exprimierten OHP2-WT und OHP2-S54A-Proteinen in *in vitro*-Phosphorylierungsassays konnte die Phosphorylierbarkeit bestätigen, allerdings führte der entsprechende Aminosäureaustausch nur zu einer Abschwächung, nicht aber zur völligen Abwesenheit des OHP2-Phosphorylierungssignals (Abb. 3.4). Vom Vorliegen mindestens einer weiteren phosphorylierbaren Aminosäure in OHP2 muss daher ausgegangen werden. Die Phosphorylierung konnte sowohl bei Inkubation im Licht als auch in Dunkelheit beobachtet werden, eine relative Quantifizierung war aufgrund der im Licht in Gegenwart des Pflanzenextraktes stattfindenden Degradation der rekombinanten Proteine nicht möglich. Da die Phosphorylierung sowohl bei der Verwendung von Chloroplasten- als auch von Thylakoidextrakten ablief, kann von einer Thylakoidmembran-gebundenen Kinase ausge-

gangen werden. Durch Phosphorylierungen wird eine Vielzahl an Prozessen im Chloroplasten reguliert, weswegen eine Funktionszuschreibung der OHP2-Phosphorylierung an dieser Stelle reine Spekulation wäre. Aufgrund der vermutlich nicht vorliegenden (und daher nicht der Regulierung bedürftigen) enzymatischen Aktivität von OHP2 scheint aber eine Modulation von OHP2-Proteininteraktionen durch die Phosphorylierung wahrscheinlich zu sein.

Eine weitergehende Charakterisierung der OHP2-Phosphorylierung könnte in der Identifizierung der spezifischen Bedingung(en) der Phosphorylierung (bzw. Dephosphorylierung), der weiteren Phosphorylierungsstellen sowie der verantwortlichen Kinase(n) bestehen. Eine Verwendung von Punktmutanten zur Komplementation von *ohp2* könnte Aufschluss über die *in vivo*-Funktion der Phosphorylierungsstellen geben. Im Hinblick auf das Serin 54 lässt sich feststellen, dass die generelle Phosphorylierbarkeit an dieser Position nicht essentiell für die Funktion von OHP2 sein kann, da dessen Verlust im Zuge der Deletion des gesamten ProRS-Bereiches (Δ ProRS, Deletion der Aminosäuren 49-81) die Komplementationsfähigkeit von *ohp2* nicht negativ beeinflusste. Vergleichbar mit GUN4 (RICHTER *et al.* 2016b) kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass im Gegenteil eine konstitutive Phosphorylierung (experimentell zugänglich in Form einer S54D-Variante) die Funktion von OHP2 beeinträchtigt.

4.6 Einfluss der OHPs und LIL3 auf und mögliche Verbindungen zur Chlorophyllbiosynthese

Die Abwesenheit der OHPs bewirkt eine sekundäre Inaktivierung der Chlorophyllbiosynthese Die cyanobakteriellen Hlips sind möglicherweise neben ihrer Funktion in der Assemblierung der Photosysteme in die Regulation der Chl-Biosynthese involviert (Abschnitt 1.3.3.2). Um einer Verbindung der OHPs zur Chl-Biosynthese nachzugehen, wurden die Gehalte von Chl-Biosyntheseenzymen sowie Intermediaten der TP-BS in den VIGS-Linien quantifiziert: Während alle untersuchten Protein- und Intermediat-Gehalte in VIGS-OHP1 denen in VIGS-GFP entsprachen, waren beide in VIGS-OHP2 mit Ausnahme von CHLG deutlich reduziert (HEY *et al.* 2018a, Fig. 3A, C). Dies betraf sowohl die Enzyme der ALA-Synthese als auch die des Chl-Zweigs. Da die entsprechenden Transkriptmengen aber unverändert waren (HEY *et al.* 2018a, Suppl. Fig. 5), lassen sich die verringerten Proteinmengen nur durch eine posttranslationale (und vermutlich weitestgehend unspezifische) Destabilisierung erklären. In den niedrigeren Mengen insbesondere an GluTR in VIGS-OHP2 ist der Grund für die nur knapp halb so hohe ALA-Syntheserate zu finden (HEY *et al.* 2018a, Fig. 3B). Die geringere ALA-Syntheserate wiederum dürfte für die verringerten Intermediat-Gehalte verantwortlich sein.

Interessanterweise war umgekehrt der Gehalt beider OHP-Varianten in Mutanten von Chl-Biosyntheseenzymen (mit Ausnahme einer leichten Reduktion in *gun4-3*) nicht verändert (Abb. 3.5 A). Diese Linien zeichnen sich aufgrund des reduzierten Flusses an Intermediaten, d.h. der geringeren Chl-Syntheseleistung durch einen hellgrünen makroskopischen Phänotyp aus. Auf molekularer Ebene bedeutet dies eine Limitierung in der Versorgung photosynthetischer Proteine mit Chl, was unmittelbar zu einer Reduktion der Antennenproteine aufgrund einer Degradation der Chl-freien Apoproteine führt. Dass die OHPs unter diesen Bedingungen nicht destabilisiert werden bedeutet einerseits, dass eine Absättigung des OHP-Heterodimers mit Pigmenten nicht essentiell

für dessen Stabilität ist. In der Tat ist dies anzunehmen, da wie oben dargelegt auch in den OHP-AAA-Komplementationslinien trotz der anzunehmenden Unfähigkeit des WT/AAA-OHP-Heterodimers zur Pigmentbindung mindestens WT-ähnliche Gehalte beider OHPs akkumulierten. Alternativ ließe sich eine (im Vergleich zu den LHCPs) besonders hohe Affinität der OHPs zu Pigmenten postulieren, welche folglich auch unter Bedingungen limitierter Chl-Verfügbarkeit zu einer ausreichenden Versorgung des OHP-Dimers mit Pigmenten führen könnte.

Die reduzierte ALA-Syntheserate in VIGS-OHP2 stand in Übereinstimmung mit entsprechenden Beobachtungen in Hlip-Deletionsmutanten (XU *et al.* 2002; YAO *et al.* 2012). Wäre die ausbleibende Stimulation der ALA-Biosynthese durch die OHPs ein entscheidender Aspekt des *ohp*-Mutantenphänotyps, so müsste die Anzucht der *ohp*-Mutanten in Gegenwart von ALA zu einer partiellen Komplementation führen können. Dies war jedoch nicht der Fall, und insbesondere *ohp2* wuchs bei Anwesenheit von 100µM ALA im Medium noch schlechter als im ALA-freien Medium (Abb. 3.5 B). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies auf die Akkumulation phototoxischer Intermediate und dadurch verursachten oxidativen Stress zurückzuführen ist. Die verringerte ALA-Syntheserate in VIGS-OHP2 lässt sich daher vermutlich vollständig auf die Destabilisierung der entsprechenden Enzyme zurückführen, und steht in keinem spezifischen Zusammenhang mit der Abwesenheit der OHPs. Auch wenn keine umfassenden Studien von ALA-Syntheseraten in Mutanten der Photosystem-Assemblierung vorliegen, so kann angenommen werden, dass eine Restriktion der ALA-Syntheserate ein genereller Effekt in solchen Mutanten ist. Auf diesem Weg würde die Akkumulation freier Chl-Moleküle bzw. von Zwischenprodukten verhindert werden. In der Regulation der ALA-Synthese leistet die proteolytische Aktivität der Clp-Protease gegenüber der GluTR einen signifikanten Beitrag (APITZ *et al.* 2016), weswegen eine spezifische Degradation dieses Enzyms in VIGS-OHP2 nicht ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zur OHP-Deregulation bewirken Mutanten von Chl-Biosyntheseenzymen (wie bei Expression einer *CHLG-Antisense-RNA*) zum Teil aber auch reduzierte ALA-Syntheseraten über eine transkriptionale Kontrolle der GluTR-Expression (SHALYGO *et al.* 2009).

LIL3 stabilisiert spezifisch CHLP und POR Neben der etablierten Interaktion von LIL3 zu CHLP, sowie weiteren potentiellen Interaktionen zu CHLG und POR (TANAKA *et al.* 2010; MORK-JANSSON *et al.* 2015b) wurde die stabilisierende Wirkung von LIL3 gegenüber CHLP in der Literatur bereits umfassend beschrieben (TANAKA *et al.* 2010; TAKAHASHI *et al.* 2014). Eine funktionelle Verbindung von LIL3 zur Chl-Biosynthese erschien daher wahrscheinlich, sodass der Effekt einer LIL3-Defizienz auf die Chl-Biosynthese genauer untersucht werden sollte. Da die *lil3*-Einzelmutanten im Gegensatz zu den *ohp*-Mutanten aufgrund der funktionellen Redundanz von LIL3.1 und LIL3.2 phänotypisch unauffällig sind, wurden die *lil3*-Doppelmutante bzw. VIGS-LIL3.1/LIL3.2-Linien analysiert: Es zeigte sich, dass (vor allem im Gegensatz zu den VIGS-OHP2-Linien) eine spezifische Destabilisierung von CHLP sowie POR zu beobachten war (HEY *et al.* 2017, Fig. 2B, 3C). Die anderen untersuchten Proteine der TP-BS waren im Wesentlichen unverändert. Als Konsequenz der reduzierten CHLP-Menge in den VIGS-LIL3.1/LIL3.2-Linien sank der Gehalt an phytylierten Chl a und b-Spezies auf weniger als 20% des Gesamt-Chl-Gehalts. Zusätzlich waren auch die Intermediate des Chl-Zweigs der TP-BS MgP, MgPMME, Pchlid und Chlid stark reduziert. Dieser Effekt lässt sich vermutlich auf die Reduktion der ALA-Syntheserate in den VIGS-LIL3.1/LIL3.2-Linien

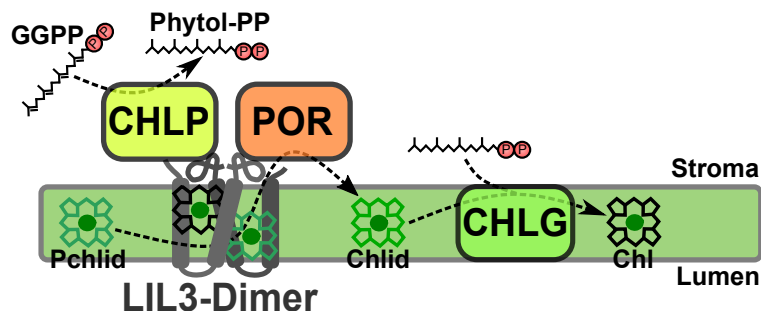


Abbildung 4.4: Modell der LIL3-Funktion in der späten Chl-Biosynthese. Ein LIL3-Homo- oder Heterodimer bindet CHLP und POR an die Thylakoidmembran. CHLP reduziert GGPP zu Phytol-PP. POR wird vermutlich von LIL3 mit seinem Substrat Pchlid versorgt, welches zu Chlid umgesetzt wird. CHLG kombiniert Phytol-PP und Chlid im finalen Syntheseschritt zu Chl. GGPP bzw. Phytol-PP können sowohl löslich als auch membrangebunden sein (MOORE 2018).

zurückzuführen (HEY *et al.* 2017, Fig. 4C-F). Interessant ist zudem, dass in *porB*-Mutanten eine erhöhte Akkumulation von LIL3.1 und LIL3.2 zu beobachten war (HEY *et al.* 2017, Fig. 6B). Hierbei könnte es sich um einen kompensatorischen Effekt handeln.

LIL3 interagiert über seine N-terminale globuläre Domäne mit POR (HEY *et al.* 2017, Suppl. Fig 2B). Die Interaktionsstelle von LIL3 mit CHLP ist nicht bekannt. Die Beteiligung der konservierten Aminosäuren im Chl-Bindemotiv von LIL3 an der Interaktion zu CHLP wurde zwar postuliert (TAKAHASHI *et al.* 2014), erscheint jedoch unwahrscheinlich angesichts der Tatsache, dass diese Aminosäuren in der TMH lokalisiert sind und CHLP ein lösliches Protein ist. CHLP interagiert vermutlich eher wie POR mit der globulären Domäne oder alternativ mit dem C-terminalen Abschnitt von LIL3, der wie die globuläre Domäne ins Stroma zeigt. Insofern wäre es denkbar, dass ein LIL3-Dimer gleichzeitig sowohl ein Molekül POR als auch CHLP binden kann (Abb. 4.4).

Weder LIL3 noch die OHPs zeigen eine physische Interaktion zu CHLG Während die Interaktion zwischen der N-terminalen, globulären Domäne von LIL3 mit POR durch Pulldown-, BiFC- und Yeast-2-Hybrid-Experimente bestätigt werden konnte, wurden keine Hinweise gefunden, die eine stabile Interaktion zwischen LIL3 und CHLG stützen würden (HEY *et al.* 2017, Fig. 5, Suppl. Fig. 2). Obwohl für die Hlips eine direkte Verbindung zu ChlG gezeigt und für LIL3 eine solche postuliert wurde, konnten in dieser Arbeit weder Interaktionen bestätigt, noch stabilisierende Einflüsse der OHPs/LIL3 auf CHLG beobachtet werden. Vielmehr erwies sich das (membranständige) CHLG-Protein als bemerkenswert stabil, selbst in Linien mit beeinträchtigter Thylakoidmembranstruktur wie den VIGS-OHP2-Linien (HEY *et al.* 2018a, Fig. 3C). Nichtsdestotrotz ist die Annahme einer funktionellen Verbindung zwischen CHLG und der Synthese bzw. Integration Chl-bindender Proteine naheliegend, da dies einen effizienten Chl-Transfer gewährleisten würde. Die pflanzlichen OHPs scheinen im Gegensatz zu den homologen cyanobakteriellen Hlips diesbezüglich aber unzweifelhaft anders zu funktionieren, weswegen einerseits die funktionelle Charakterisierung der weiteren, weitestgehend unbeachteten Vertreter der LHC-Familie (ELIPs und insbesondere SEPs) Aufschluss über deren mögliche Verbindung zu CHLG geben könnte. Andererseits wäre es konsequent, von CHLG ausgehend nach möglichen Interaktionspartnern zu suchen. Letztendlich kann aber sowohl für LIL3 als auch für die OHPs nicht ausgeschlossen werden, dass transiente Interaktionen zu CHLG existieren, diese aber nicht stabil genug sind, um in den gängigen *in vitro*-Experimenten detektiert werden zu können.

Während der PSII-Reparatur wird im Zuge der D1-Degradation Chl und β -Car freigesetzt. YAO *et al.* (2007) schlugen eine Chl-Speicherfunktion von HliA/HliB während der PSII-Reparatur vor. Dazu passt die Beobachtung, dass ein PSI-defizienter, Hlip⁻-Stamm eine deutlich gegenüber den Kontroll-Stämmen (nur PSI-defizient) verringerte Halbwertszeit von Chl aufwies (YAO *et al.* 2012). Möglicherweise wird freigesetztes Chl in den Hlip⁻-Stämmen in größerem Maße abgebaut, da es nicht gespeichert werden kann. Dem gegenüber steht jedoch die Hypothese, dass aus PSII freigesetztes Chl vermutlich vollständig in Chlid und den Phytol-Rest gespalten wird (VAVILIN *et al.* 2007). Sowohl Chlid als auch der Phytol-Rest (nach dessen Phosphorylierung) können von CHLG recycelt und das synthetisierte Chl dann in neue D1-Proteine eingebaut werden (KOMENDA *et al.* 2012b; LIN *et al.* 2014). In diesem Fall sollte eher ein Speicherbedarf für Chlid denn für Chl bestehen. In *Arabidopsis* zählt die Speicherung von Chl(id) angesichts der oben beschriebenen Ergebnisse höchstwahrscheinlich nicht zu den Funktionen der OHPs. Als weitere Kandidaten der LHC-Familie bieten sich dafür jedoch insbesondere die SEPs an, auch wenn für die ELIPs von HUTIN *et al.* (2003) bereits eine Speicherfunktion vorgeschlagen wurde: Die konstitutive Expression der SEP-Gene sowie deren erhöhte Expression unter Stressbedingungen (HEDDAD *et al.* 2000) korrelieren mit einem erhöhten D1-Umsatz, ergo einem erhöhten Bedarf an Chl(id)-Speicherkapazität unter Stressbedingungen. Die Nichtbeteiligung der OHPs an der Chlid-Speicherung macht auch Sinn angesichts der nicht etablierbaren Interaktion mit CHLG: Eine Interaktion des Chlid-Speichers mit CHLG ist unumgänglich, da Chlid an CHLG zur Chl-Synthese abgegeben werden muss. Dass LIL3 *in vitro* nicht nur zur Bindung von Chl, sondern auch der Chl-Vorstufen fähig war (s.u.), lässt eine grundsätzliche Befähigung dazu auch der anderen Vertreter der LHC-Familie vermuten. Dass die Chl-Vorstufen (insbesondere diejenigen mit bereits inseriertem Mg²⁺-Ion) Chl chemisch sehr ähnlich sind, könnte die Befähigung von LIL3 zur Mg-Porphyrin-Bindung erklären. Ob eine potentielle Bindung von Chl-Vorstufen (insbesondere *in vivo*) für die Funktion der Vertreter der LHC-Familie von Bedeutung ist, müssen weitergehende Analysen zeigen.

LIL3 bindet Tetrapyrrole und dient als Substratcarrier zwischen den späten Enzymen der Chlorophyllbiosynthese Eine generelle Befähigung von LIL3 zur Chl-Bindung *in vitro* wurde von MORK-JANSSON *et al.* (2015a) beschrieben, und die Autoren fanden Hinweise darauf, dass die Heterodimerisierung von LIL3.1 mit LIL3.2 (aufgrund der Affinitäten beider Isoformen zueinander bzw. zu Chl a) einer Chl-Bindung vorausgehen sollte. Weitere Studien der gleichen Autoren zeigten jedoch, dass eine Rekonstitution von LIL3 auch mit den Einzelproteinen möglich war (MORK-JANSSON *et al.* 2018), wenngleich die Rekonstitution mit einer Mischung von LIL3.1 und LIL3.2 stabilere Komplexe ergab. Insofern unterscheidet sich die LIL3-Pigmentbindung signifikant von der der OHPs, welche, wie oben dargelegt, auf die Bildung von Heterodimeren zur Pigmentbindung zwingend angewiesen sind. Während die konservierten Aminosäuren im Chl-Bindemotiv für die Funktion der OHPs unabdingbar sind, trifft dies für LIL3 nur eingeschränkt zu: Entsprechende LIL3.1-AAA-Konstrukte (mit einer leicht von den OHP-AAA-Konstrukten abweichenden Auswahl der mutierten Aminosäuren, vgl. Abschnitt 1.3.2.4) waren zur partiellen Komplementation von *lil3.1/lil3.2* in der Lage. Eine Überakkumulation des LIL3.1-AAA-Proteins hatte sogar die vollständige Komplementation zur Folge (TAKAHASHI *et al.* 2014). Ein interessanter Unterschied bestand jedoch darin, dass die Bildung der im WT nachweisbaren LIL3-CHLP-Komplexe

in den LIL3.1-AAA-Linien unterbunden war, die entsprechenden Aminosäuren also für die LIL3-Dimerisierung bzw. die Komplexbildung zwischen LIL3 und CHLP wichtig sein könnten. Die hochmolekularen LIL3-CHLP-Komplexe werden als Voraussetzung für das Erreichen der maximalen CHLP-Aktivität angesehen (TAKAHASHI *et al.* 2014). Interessant war weiterhin, dass auch LIL3.1-Varianten mit ausgetauschter TMH (d.h. vollständigem Verlust des Chl-Bindemotivs) zur Komplementation in der Lage waren (TAKAHASHI *et al.* 2014). Hier besteht ein auffälliger Unterschied zu den OHPs, welche durch den Funktionsverlust der TMH in den AAA-Linien ihre Komplementationsfähigkeit einbüßten. Zusätzlich war wie erwartet die OHP2- Δ C-Variante absolut nicht zur Komplementation von *ohp2* in der Lage. Da die Interaktion von OHP2 mit OHP1 innerhalb der TMH stattfinden dürfte, lässt sich für die Verwendung einer OHP2-Variante mit ausgetauschter TMH (aufgrund einer anzunehmenden Destabilisierung von OHP1) ebenfalls nicht vom Vorliegen einer Komplementationsfähigkeit ausgehen. Zusammengenommen lässt sich im Fall von LIL3 daher aussagen, dass dessen Funktion nicht zwangsläufig auf das Vorliegen der TMH angewiesen ist, auch wenn das Erreichen der vollen Aktivität vermutlich damit zusammenhängt (TAKAHASHI *et al.* 2014). Eine weitergehende Analyse der LIL3.1-AAA-Variante wäre sinnvoll, um den Einfluss der Punktmutationen auf die Chl-Bindeeigenschaft der konservierten Aminosäuren in LIL3 abschätzen zu können.

Aufgrund der für LIL3 vermuteten Rolle in der Organisation der Chl-Biosynthese wurde untersucht, ob LIL3 neben Chl auch zur Bindung anderer Tetrapyrrole in der Lage war: Die Analyse der Affinität von LIL3 zu Proto IX und den späten Intermediaten des Mg-Zweigs ergab, dass LIL3 grundsätzlich zur Bindung aller dieser Intermediate imstande war. Interessanterweise zeigte LIL3 dabei die höchste Affinität gegenüber Pchlid (HEY *et al.* 2017, Fig. 8, Tab. 1). Entsprechend lässt sich vermuten, dass LIL3 innerhalb der Thylakoidmembran als Substratcarrier zwischen den späten Enzymen der Chl-Biosynthese funktioniert. Der Vorteil einer solchen Carrierfunktion wäre eine reduzierte Verlustrate der phototoxischen Intermediate zwischen den einzelnen Enzymschritten. Damit könnten deren *Steady State*-Level insgesamt niedrig gehalten werden, was Photosensibilisierung vermeiden würde. Insbesondere die hohe Affinität zu Pchlid würde bedeuten, dass LIL3 als lokale Senke für dieses Intermediat in der Membran dienen könnte, um es dann an interagierendes POR-Enzym weiterzuleiten. Indem LIL3 mit CHLP und POR die beiden Enzyme der Chl-Biosynthese vor dem finalen CHLG-Schritt bindet, würde es für eine räumliche Nähe in der Synthese beider Chl-Edukte sorgen. Dies würde die Versorgung von CHLG mit den Chl-Vorstufen Phytol-Pyrophosphat und Chlid begünstigen (Abb. 4.4).

4.7 Gemeinsamkeiten der LIL3- und OHP-Funktionsweise: Dimerbildung und Stabilisierung löslicher Proteine durch Bindung an die Thylakoidmembran

Bei aller Divergenz zwischen den dargelegten Funktionen von LIL3 und den OHPs (u.a. Nicht- bzw. Essentialität der Chl-Bindung für die Funktion und Verbindung zur TP-BS bzw. PS-Assemblierung) lassen sich zwei interessante Parallelen zwischen beiden Vertretern der LHC-Familie ziehen:

(i) Beide Proteine funktionieren vermutlich als Dimer. Für die OHPs ergibt sich dies unmittelbar aus den oben dargelegten Ergebnissen. Hinsichtlich LIL3 sind die Hinweise zwar weniger direkt, unter der Annahme einer grundsätzlich ähnlichen Funktion der Vertreter der LHC-Familie und

der Beobachtung, dass eine (Hetero)dimerisierung von LIL3 der Pigmentbindung vorausgeht (MORK-JANSSON *et al.* 2015a), ist eine Dimerfunktion aber auch für LIL3 wahrscheinlich. Im Fall der OHPs werden ausschließlich Heterodimere gebildet, während die Situation bei den LIL3-Proteinen weniger eindeutig ist. Angesichts der großen Sequenzidentität von LIL3.1 und LIL3.2 (HEY *et al.* 2017, Fig. 1), sowie deren funktioneller Redundanz lässt sich aber annehmen, dass auch LIL3-Homodimere aktiv sind. Die Notwendigkeit zur intermolekularen Dimerisierung von LIL3 und OHP1/OHP2 ist angesichts der Bildung intramolekularer Dimere in Form von Helix 1–Helix 3-Paaren bei den LHCPs (und PsbS) unmittelbar verständlich. In einer zukünftigen Analyse der SEPs sollte dieser Punkt daher entsprechende Aufmerksamkeit erhalten.

(ii) Sowohl die OHPs (\Rightarrow HCF244) als auch LIL3 (\Rightarrow CHLP/POR) binden eigentlich lösliche Proteine an die Thylakoidmembran und stabilisieren sie auf diese Weise bzw. schützen sie vor proteolytischem Abbau. Obwohl die Transkriptmengen der entsprechenden Interaktionspartner in Abwesenheit der OHP- bzw. LIL3-Proteine nicht verändert sind, ist eine Verringerung der Proteinmengen bis an die Nachweisgrenze zu beobachten. Dies lässt auf die Aktivität posttranslationaler Mechanismen schließen, wobei eine plastidäre Proteaseaktivität, die nicht-membrangebundenes Protein erkennt und degradiert, als am wahrscheinlichsten anzunehmen ist. Ob es sich dabei um einen spezifischen Effekt handelt, d.h. HCF244, CHLP bzw. POR in nicht-membrangebundener Form schädlich sind und daher ein Verzicht auf diese Proteine einschließlicher der daraus resultierenden drastischen Effekte bewusst in Kauf genommen wird, oder ob der Abbau ein ungewünschter Effekt ist, bleibt offen. Das Vorliegen eines unspezifischen Effektes erscheint jedoch wahrscheinlicher. CHLP, welches auch im *lil3.1/lil3.2*-Hintergrund durch die Fusion mit einer TMH (und der damit einhergehenden Membranbindung) aktiv war und partiell den LIL3-Verlust komplementierte, ist im WT daher letztlich nur auf die durch LIL3-vermittelte Membranassoziation angewiesen. Im Gegensatz dazu reichte die Aktivität der membrangebundenen HCF244-TMH-Variante im *ohp2*-Hintergrund nicht zur Komplementation aus. Bei einer zukünftigen Analyse der ELIPs/SEPs sollte der Aspekt der Stabilisierung von Interaktionspartnern besondere Beachtung finden.

Es bleibt offen, warum die *lil3.1/lil3.2*-Mutante durch Expression einer membrangebundenen CHLP-Variante komplementiert werden konnte, obgleich LIL3 wie gezeigt auch eine wichtige Rolle in der Stabilisierung von POR spielt. Beachtet werden muss dabei jedoch, dass in den CHLP-TMH-Linien keine vollständige Komplementation erreicht wurde (TAKAHASHI *et al.* 2014). Der Gehalt von POR in diesen Linien wurde zudem nicht untersucht. Da POR auch mit CHLP interagiert (MORK-JANSSON *et al.* 2015b), wäre bei einer signifikanten Akkumulation von POR in diesen Linien davon auszugehen, dass es über die Bindung zu CHLP wenigstens partiell stabilisiert werden kann. Andererseits wurden bereits weitere POR-bindende Aktivitäten wie das Pitt-Protein (SCHOTTKOWSKI *et al.* 2009) beschrieben (auch wenn die Identifizierung des pflanzlichen Homologs (falls vorhanden) noch aussteht), die zumindest partiell zur Stabilisierung von POR in Abwesenheit von LIL3 beitragen könnten.

4.8 Zusammenfassung und Ausblick

LIL3 koordiniert die späten Schritte der Chlorophyllbiosynthese Die beiden funktionell redundanten LIL3-Proteine bilden wahrscheinlich Homo- und Heterodimere und interagieren mit CHLP und POR. Mit Phytol-PP und Chlid liefern diese beiden Enzyme die direkten Chl-Vorstufen für den finalen, von CHLG katalysierten Chl-Syntheseschritt. Sowohl bei CHLP als auch bei POR handelt es sich um lösliche Proteine, die durch die LIL3-vermittelte Bindung an die Thylakoidmembran vor proteolytischem Abbau geschützt und somit stabilisiert werden. Entsprechend führt die Inaktivierung beider *LIL3*-Gene zu einer posttranslationalen Destabilisierung von CHLP und POR. (Dimeres) LIL3 bindet neben Chl auch Proto IX, MgP, MgPMME und Pchlid. Es wird daher angenommen, dass LIL3 innerhalb der Thylakoidmembran als Carrier für die späten Intermediate der TP-BS wirkt, und insbesondere interagierendes POR-Protein mit dessen Substrat Pchlid versorgt. Eine räumliche Nähe der Chlid- und Phytol-PP-Synthese würde sich positiv auf die koordinierte Substratanlieferung für die nachfolgende CHLG-Reaktion auswirken.

OHP1 und OHP2 steuern die initialen Schritte der PSII-Assemblierung OHP1 und OHP2 bilden ausschließlich gemeinsame Heterodimere. Sowohl die Einzelproteine als auch Varianten mit mutiertem Chl-Bindemotiv sind nicht mehr zur Pigmentbindung in der Lage und dadurch weitestgehend inaktiv (mit Ausnahme von OHP2 in VIGS-OHP1-Linien). Das OHP1-OHP2-Heterodimer bindet Chl und Carotinoide im ungefähren 3:1-Verhältnis und gleicht darin dem cyanobakteriellen HliC/HliD-Dimer. Der PSII-Assemblierungsfaktor HCF244 assoziiert mit dem membranständigen OHP-Heterodimer und wird über diese Interaktion stabilisiert. Konsequenterweise führt daher die Inaktivierung der *OHP*-Gene zu reduzierten HCF244-Leveln. Zusätzlich stabilisieren sich OHP1 und OHP2 gegenseitig, wobei OHP2 die dominante Rolle einnimmt; HCF244 wirkt stabilisierend auf die Bindung von OHP1 an OHP2. Der heterotrimere OHP1-OHP2-HCF244-Komplex ist für die Synthese von D1 und damit die PSII-Assemblierung wesentlich: In Abwesenheit des funktionellen Heterotrimers (Abwesenheit von Einzelkomponenten bzw. Austausch der einzelnen Proteine mit inaktiven Varianten) ist die D1-Syntheserate stark reduziert. Die exakte molekulare Funktion von HCF244 im Komplex ist dabei unklar, die Rolle der OHPs besteht aller Voraussicht nach in der Beladung von pD1 mit Pigmenten sowie dem Quenching von Anregungsenergie über die gebundenen Carotinoide.

Ausblick Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein wesentlicher Erkenntnisgewinn hinsichtlich der biologischen Funktion zweier Vertreter der LHC-Proteinfamilie erzielt werden. Bestimmte Punkte konnten jedoch nicht abschließend bearbeitet werden, sodass zukünftige Analysen den Schwerpunkt auf die folgenden Aspekte legen sollten:

- Entscheidend für das Verständnis des OHP1-OHP2-HCF244-Komplexes ist die molekulare Funktion von HCF244. Wie gezeigt werden konnte, beruht diese auf den zwischen SDR-Proteinen konservierten Aminosäurepositionen. Ein möglicher erster Ansatzpunkt wäre die Analyse der Cofaktor-Bindung von HCF244 bzw. die Bearbeitung der Frage, ob und wenn ja welche katalytische Aktivität HCF244 besitzt, oder ob das Protein ausschließlich als Scaffold-Protein funktioniert.

- Die pflanzliche OHP2-Variante unterscheidet sich von den cyanobakteriellen Hlips im Besonderen durch den Prolin-reichen Sequenzabschnitt (ProRS) am N-Terminus. Dieser ist ein Hinweis darauf, dass die OHPs gegenüber den Hlips im Laufe der Evolution zusätzliche Funktionen entwickelt haben. Obgleich eine vermutete Interaktion des ProRS-Abschnitts zum plastidären Ribosom nicht bestätigt werden konnte, ist eine Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen anzunehmen. Diese Interaktion mit bislang unbekannten Interaktionspartnern ist aber (wie in den Δ ProRS-Komplementationslinien gezeigt werden konnte) nicht essentiell. Mittels rekombinanter Expression des ProRS-Teils und Durchführung von Pulldown-Experimenten könnten mögliche Kandidaten für eine Interaktion identifiziert, und anschließend die funktionelle Relevanz der Interaktion analysiert werden.
- Weder für LIL3 noch für die OHPs konnte eine Interaktion zu CHLG nachgewiesen werden, und die beiden Vertreter der LHC-Familie scheinen auch nicht miteinander zu interagieren. Einerseits bleibt daher offen, woher das OHP-Heterodimer Chl-Moleküle zur Weitergabe an pD1 erhält. Andererseits ist nicht klar, wohin CHLG Chl-Moleküle abgibt. Schließt man eine ungerichtete Abgabe von Chl in die Thylakoidmembran aus, so dürften bisher unidentifizierte Interaktionspartner eine Rolle spielen. Es wäre daher notwendig, von CHLG aus nach möglichen Interaktionspartnern zu suchen. Der Frage, ob und wenn ja welche Rolle die bisher weitestgehend uncharakterisierten SEPs in der Regulation der Chl-Biosynthese bzw. der Assemblierung der Photosysteme spielen, sollte durch eine Analyse der Mutanten nachgegangen werden. Möglicherweise lässt sich eine Interaktion zwischen den SEPs und OHPs/LIL3 etablieren. Die Frage, ob eine Funktion der SEPs in der Speicherung von Chl(id) während der PSII-Reparatur bzw. eine Interaktion der SEPs zu CHLG nachgewiesen werden kann, wären wichtige Aspekte einer Funktionsanalyse der SEPs.
- Interessante Einzelaspekte der Funktionen von OHP1 und OHP2 betreffen die Phosphorylierung von OHP2 und den proteolytischen Abbau von OHP1: Nach Identifizierung der weiteren Phosphorylierungsstelle(n) von OHP2 könnten entsprechend mutierte Komplementationskonstrukte Aufschluss über die *in vivo*-Funktion der OHP2-Phosphorylierung liefern. In Hinblick auf OHP1 wäre die Identifizierung der für die Degradation von OHP1 zuständigen Protease über Doppelinaktivierungsexperimente von OHP2 und Protease-Genen ein wichtiger Schritt in der Frage, wie und warum der proteolytische Abbau von OHP1 in Abwesenheit von OHP2 stattfindet.
- Schlussendlich ist eine wichtige Detailfrage, wie genau die Pigmentbindung des OHP-Heterodimers auf molekularer Ebene funktioniert. Obwohl experimentell herausfordernd, wäre die Aufreinigung homogener Komplexe gefolgt von Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse (alternativ die Nutzung NMR-spektroskopischer Methoden) ein zielführender Ansatz. Außerdem müsste eingehender untersucht werden, ob die vom OHP-Heterodimer gebundenen Carotinoide analog zur Funktion der Hlips zum Quenching von Chl-Triplets in der Lage sind, d.h. photoprotektiv wirken können. Dies könnte mit dem Einsatz zeitaufgelöster Fluoreszenz-spektroskopischer Methoden analysiert werden.

5 Materialien und Methoden

Für die Ergebnisse der drei zu dieser kumulativen Dissertation gehörigen Veröffentlichungen (HEY *et al.* 2017; HEY *et al.* 2018a; HEY *et al.* 2018b) sei auf die dort beschriebenen Methoden verwiesen. Daher folgt an dieser Stelle nur eine Beschreibung der im Abschnitt 3 eingesetzten Methoden.

5.1 Materialien

Alle **Chemikalien** wurden von Carl Roth, Sigma-Aldrich, Serva Electrophoresis GmbH, Duchefa, VWR oder Thermo Scientific bezogen. **Enzyme** wurden bei Thermo Scientific oder New England Biolabs erworben, **Antikörper** bei Agrisera oder UBP-Bio.

5.2 Pflanzenlinien und Pflanzenanzucht

5.2.1 Pflanzenanzucht auf Erde

Arabidopsis-Samen wurden auf einem Gemisch aus GS-90 Einheitserde und Vermiculit (3:1) ausgebracht und zwei Tage bei 4°C stratifiziert, bevor die weitere Anzucht in Anzuchtkammern unter Kurztag- (8h Licht), Langtag- (16h Licht) oder Dauerlicht-Bedingungen stattfand (standardmäßig bei 100µmol Photonen s⁻¹ m⁻²). Der VIGS-Assay wurde mit 12 Tage alten, unter Langtag-Bedingungen angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen wie in HEY *et al.* (2018a) beschrieben durchgeführt. Für die Infiltration mit BiFC-Konstrukten bestimmte *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen wurden auf Typ T Einheitserde unter Langtag-Bedingungen im Gewächshaus angezogen. *Pisum sativum*-Pflanzen zur Extraktion von plastidären Ribosomen wurden auf Vermiculit unter Kurztag-Bedingungen in Anzuchtkammern angezogen.

5.2.2 Sterile Pflanzenanzucht

Arabidopsis-Samen wurden zur oberflächlichen Sterilisation 5 Minuten in Meliseptol (Braun) inkubiert und anschließend 4x mit autoklaviertem Wasser gewaschen. Die Samen wurden dann auf 1/2-MS-Medium (2,2g/l MS-Salze, 0,5g/l MES pH 5,7, 8g/l Difco Agar) ohne bzw. mit 2% Saccharose ausgebracht, zwei Tage bei 4°C stratifiziert und die Platten anschließend zur weiteren Anzucht in Anzuchtkammern (100µmol Photonen s⁻¹ m⁻²) überführt.

5.2.3 Pflanzenlinien

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Pflanzenlinien aufgeführt. Die in dieser Arbeit mittels der *Floral Dip*-Methode über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation neu erzeugten Linien sind entsprechend gekennzeichnet. Die Konstrukte basierten auf dem pCAMstrepII-Vektor (HEY *et al.* 2018a) bzw. auf pCAM-BIA3301 (Cambia). Zur Selektion der Linien nach der Transformation wurden zwei Wochen alte Keimlinge mit einer BASTA-Lösung (1:2000, Bayer) behandelt. Die Genotypisierung der Linien geschah mittels PCR.

Pflanzenlinie	Eigenschaft	Referenz
Col-0	WT	–
<i>chl27</i>	T-DNA-Insertionslinie	TOTTEY <i>et al.</i> 2003

Pflanzenlinie	Eigenschaft	Referenz
<i>chlm</i>	T-DNA-Insertionslinie	PONTIER <i>et al.</i> 2007
<i>clpC1</i>	T-DNA-Insertionslinie	SJÖGREN <i>et al.</i> 2004
<i>ftsH2</i>	T-DNA-Insertionslinie	CHEN <i>et al.</i> 2000
<i>gun4-3</i>	T-DNA-Insertionslinie	LARKIN <i>et al.</i> 2003
<i>gun5-1</i>	T-DNA-Insertionslinie	MOCHIZUKI <i>et al.</i> 2001
<i>porb</i>	T-DNA-Insertionslinie	HEY <i>et al.</i> 2017
<i>hcf244</i>	T-DNA-Insertionslinie	LINK <i>et al.</i> 2012
<i>hcf244/OHP1-OX</i>	Überexpression der OHP1-CDS unter p35S ohne Tag in <i>hcf244</i> , pCAMstrepII	diese Arbeit
<i>hcf244/OHP2-OX</i>	Überexpression der OHP2-CDS unter p35S ohne Tag in <i>hcf244</i> , pCAMstrepII	diese Arbeit
HCF244-C	Überexpression der HCF244-CDS unter p35S mit Tag in <i>hcf244</i> , pCAMstrepII	HEY <i>et al.</i> 2018a
<i>hcf244/p35S::HCF244-TMH_{tAPX}</i>	Überexpression der HCF244-CDS mit C-terminaler Fusion der tAPX-TMH mit Tag in <i>hcf244</i> , pCAMstrepII	diese Arbeit
<i>ohp1</i>	T-DNA-Insertionslinie	BECK <i>et al.</i> 2017
<i>ohp1/p35S::OHP1-WT</i>	Überexpression der OHP1-CDS unter p35S ohne Tag in <i>ohp1</i> , pCAMstrepII	diese Arbeit
<i>ohp1/p35S::OHP1-AAA</i>	Überexpression der OHP1-CDS unter p35S mit SDM ohne Tag in <i>ohp1</i> , pCAMstrepII	diese Arbeit
<i>ohp1/pOHP1::OHP1-WT</i>	Expression der OHP1-CDS unter pOHP1 ohne Tag in <i>ohp1</i> , pCambia3301	diese Arbeit
<i>ohp1/pOHP1::OHP1-C76A</i>	Expression der OHP1-CDS unter pOHP1 mit SDM ohne Tag in <i>ohp1</i> , pCambia3301	diese Arbeit
OHP1-OX	Überexpression der OHP1-CDS ohne Tag in Col-0, pCAMstrepII	diese Arbeit
OHP1-RNAi	Überexpression eines OHP1-RNAi-Konstrukts in Col-0, pCAMstrepII	diese Arbeit
<i>ohp2</i>	T-DNA-Insertionslinie	BECK <i>et al.</i> 2017
<i>ohp2/p35S::OHP2-WT</i>	Überexpression der OHP2-CDS unter p35S ohne Tag in <i>ohp2</i> , pCAMstrepII	diese Arbeit
<i>ohp2/p35S::OHP2-AAA</i>	Überexpression der OHP2-CDS unter p35S mit SDM ohne Tag in <i>ohp2</i> , pCAMstrepII	diese Arbeit
<i>ohp2/p35S::HCF244-TMH_{tAPX}</i>	Überexpression der HCF244-CDS mit C-terminaler Fusion der tAPX-TMH mit Tag in <i>ohp2</i> , pCAMstrepII	diese Arbeit
<i>ohp2/pOHP2::OHP2-WT</i>	Expression der OHP2-CDS unter pOHP2 in <i>ohp2</i> , pCambia3301	diese Arbeit
<i>ohp2/pOHP2::OHP2-ΔProRS</i>	Expression der OHP2-CDS unter pOHP2 mit SDM in <i>ohp2</i> , pCambia3301	diese Arbeit
<i>ohp2/pOHP2::OHP2-ΔM</i>	Expression der OHP2-CDS unter pOHP2 mit SDM in <i>ohp2</i> , pCambia3301	diese Arbeit
<i>ohp2/pOHP2::OHP2-ΔC</i>	Expression der OHP2-CDS unter pOHP2 mit SDM in <i>ohp2</i> , pCambia3301	diese Arbeit
OHP2-OX	Überexpression der OHP2-CDS unter p35S ohne Tag in Col-0, pCAMstrepII	diese Arbeit

5.3 Bakterienanzucht und Proteinexpression

5.3.1 Anzucht von *E. coli* und *Agrobacterium*

E. coli wurde bei 37°C in/auf LB-Medium (10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl; bei Platten 15g/l Bacto Agar) angezogen, *Agrobacterium* bei 30°C in/auf YEB-Medium (5g/l Trypton, 1g/l Hefeextrakt, 5g/l Saccharose, 0,5g/l Magnesiumsulfat, pH 7,2; bei Platten 15g/l Bacto Agar). Zur Transformation von Ligationsansätzen und der Vermehrung von Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Invitrogen) verwendet. Der *Agrobacterium*-Stamm GV2260 wurde für das VIGS-System bzw. die Infiltration von *N. benthamiana*-Blättern mit BiFC-Konstrukten eingesetzt.

5.3.2 Stabile und transiente Pflanzentransformation mit *Agrobacterium*

Zur **stabilen Transformation** mittels der *Floral Dip*-Methode wurden *Arabidopsis*-Pflanzen unter Langtag-Bedingungen zur Blüte gebracht. *Agrobacterium*-Kulturen wurden abzentrifugiert (4000rpm, 20°C, 20 Minuten) und in einer Optischen Dichte von 0,8 (bei 600nm) in Inokulationsmedium (0,5x MS-Salze, 0,05% MES pH 5,7, 5% Saccharose, 0,05% Silwet L-77) resuspendiert. Anschließend wurden Knospen der zu transformierenden Pflanzen mit der *Agrobacterium*-Suspension beträufelt und die Pflanzen über Nacht in der Dunkelheit inkubiert.

Für den **VIGS-Assay** wurden *Agrobacterium*-Kulturen abzentrifugiert (4000rpm, 20°C, 20 Minuten) und in einer Optischen Dichte von 1,5 (bei 600nm) in VIGS-Medium (10mM Magnesiumchlorid, 10mM MES pH 5,7, 200 μ M Acetosyringon) resuspendiert. Nach 4 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die beiden ersten echten Blätter 12 Tage alter *Arabidopsis*-Pflanzen mit der Zellsuspension infiziert und die Pflanzen weiterhin bei Langtag-Bedingungen angezogen.

Für die **transiente Transformation** von *N. benthamiana*-Blättern für den BiFC-Assay wurden *Agrobacterium*-Kulturen abzentrifugiert (4000rpm, 20°C, 20 Minuten) und in einer Optischen Dichte von 0,6 (bei 600nm) in Infiltrationsmedium (10mM Magnesiumchlorid, 10mM MES pH 5,7, 100 μ M Acetosyringon) resuspendiert. Nach 3 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension in *N. benthamiana*-Blätter infiziert und die Pflanzen 2 Tage im Schwachlicht inkubiert.

5.3.3 Proteinexpression in *E. coli* und Proteinaufreinigung

Zur Proteinexpression wurden die entsprechenden Vektoren (s.u.) in den chemisch-kompetenten *E. coli*-Stamm Rosetta 2 (Novagen) transformiert. Die Anzucht von Übernachtskulturen geschah in LB-Medium in Anwesenheit von 37 μ g/ml Chloramphenicol und 100 μ g/ml Ampicillin bei 37°C. Die Hauptkulturen in 2YT-Medium (16g/l Trypton, 10g/l Hefe-Extrakt, 5g/l Natriumchlorid) wurden 1:100 mit den Vorkulturen angeimpft und ohne Antibiotika bei 37°C inkubiert. In Kulturen, die eine Optische Dichte von 0,6-1,0 (bei 600nm) erreicht hatten, wurde durch Zugabe von 1mM IPTG die Proteinexpression induziert und die Zellen nach weiteren 3 Stunden Inkubation bei 37°C geerntet. Die Proteinaufreinigung geschah mittels HisPur Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur Qualitätsbestimmung isolierter RNA bzw. zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurde eine Horizontalgelelektrophorese mit Agarosegelen durchgeführt. RNA (0,8 μ g pro Probe) wurde

dabei auf 1%-igen TBE-Agarosegelen aufgetrennt (0.5x TBE: 44,5mM Tris-HCl pH 8,0, 44,5mM Borsäure, 1mM EDTA) und DNA auf 0,8-1,8%-igen TAE-Agarosegelen (1x TAE: 40mM Tris-HCl pH 8,0, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA). Als Ladepuffer wurde 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) verwendet, als Größenmarker für DNA-Fragmente und Plasmide der 1kb-GeneRuler (Thermo Scientific).

5.4.2 DNA-Extraktion

Zur Extraktion von genomischer DNA wurde Blattmaterial in Extraktionspuffer (200mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM Natriumchlorid, 25mM EDTA, 0,5% SDS) homogenisiert und 2 Minuten zentrifugiert (15000rpm, 4°C, 2 Minuten). Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und zentrifugiert (15000rpm, 4°C, 15 Minuten). Das DNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit 500µl 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 15000rpm, 4°C, 5 Minuten) und nach dem Trocknen in 25µl Wasser resuspendiert.

5.4.3 Genotypisierungs-PCR

Zur Untersuchung der eingesetzten Pflanzenlinien auf Homozygotie bzw. Vorhandensein des Transgens wurden Genotypisierungs-PCRs durchgeführt. Dazu wurde die Dream Taq Polymerase (Thermo Scientific) verwendet. Das PCR-Programm wurde nach den Herstellerangaben gestaltet (95°C 30s, 35x[95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s-90s], 72°C 5min). Die Annealingtemperatur betrug stets 55°C. Es wurde jeweils auf die Anwesenheit des WT-Allels, der T-DNA und des Transgens getestet.

5.4.4 Primersequenzen

Die folgende Tabelle enthält die für die Genotypisierungs-PCR, die Klonierung und qPCR eingesetzten Primer. Der jeweilige Verwendungszweck sowie die für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme sind angeführt.

Primername	Sequenz	Verwendung
GABI_8409_LB	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Genotypisierung
HCF244_genomic_F	ACACCAGCTGACGTGG	Genotypisierung
OHP1_genomic_F	GTGTCTGAAGATCGGTATGGTTGG	Genotypisierung
OHP2_genomic_F	CGTCTTTCATTTACCATTTTGGGGAAC	Genotypisierung
cpSRP54.pET22b_NdeI_F	CATATGGAGATGTTTGGTCAGTTGAC	Klonierung
cpSRP54.pET22b_SalI_R	GTCGACGTTACCAGAGCCGAAGC	Klonierung
HCF244.pCAMstrep_SalI_F	TGTCGACCTCTCACACCGGAAAATACAATC	Klonierung
HCF244.pCAMstrep_XmaI_R	TCCCGGGGAAGTAGATGTCTGATTGCTTGG	Klonierung
Lhcb1.1.pET22b_NdeI_F	TCATATGAGGAAGACTGTTGCCAAGC	Klonierung
Lhcb1.1.pET22b_XhoI_rv	TCTCGAGCTTTCCGGGAACAAAGTTG	Klonierung
OHP1.SDM.C76A_F	CTCACGAGCTGCCATGATTGGTCTC	Klonierung
OHP1.SDM.C76A_R	GAGACCAATCATGGCAGCTCGTGAG	Klonierung
OHP1.pET22b_NdeI_F	TCATATGGCCGCAAACTTCCTGAAG	Klonierung
OHP1.pET22b_XhoI_R	TCTCGAGTAGAGGAAGATCGAGTCCTTTCC	Klonierung
OHP1.pCAMBIA.XbaI_F	TTCTAGATGGAATGTTATTCTTGATGCATG	Klonierung
OHP1.pCAMBIA.DraIII_R	TCACTTTGTGAGAAGTAATAGCTTTAGCAA- GAGGTAAGC	Klonierung
OHP1.RNAi.BglII_R	TAGATCTTTATAGAGGAAGATCGAGTCCTTTCC	Klonierung
OHP1.RNAi.XhoI_F	TCTCGAGTCATTGCCATGGTCGGAG	Klonierung
OHP1.SDM.AAA_F	CACAAACAGCTGCGATATGGGGCTCAGCAG- CTTGCATGATTG	Klonierung

Primername	Sequenz	Verwendung
OHP1_SDM_AAA.F	CAATCATGCAAGCTGCTGAGCCCCATATCG- CAGCTGTTTGTG	Klonierung
OHP1_pCAMstrep_XhoI.F	TCTCGAGATGAGCTCGTCGCCGTATC	Klonierung
OHP1+stop_pET22b_XmaI.R	CCCGGGTTATAGAGGAAGATCGAGTCCTTTCC	Klonierung
OHP2_3'UTR_XmaI.F	CCCGGGTAAGAGTGTGTGTTATATATAGA-CAGATCC	Klonierung
OHP2_5'UTR_XhoI.R	TCTCGAGTTTTTTTGTGTAGTTGAATTGTCTGA-TTTTC	Klonierung
OHP2_pET22b_ΔC_XhoI.R	CTCGAGGGGTTGGAAACCAAAAAAGG	Klonierung
OHP2_pET22b_NdeI.F	TCATATGTGCTCTCAGACAGAAGGTCCTTTA	Klonierung
OHP2_pET22b_stop_XhoI.R	TTTCCGCTCGAGTTATCCAAGTCTAGAATG-CCGAAA	Klonierung
OHP2_pET22b_XhoI.R	TCTCGAGTTCCAAGTCTAGAATGCCGAAA	Klonierung
OHP2_ΔC...F	GGTTTCCAACCAAAAAATTAAGAGTGTGTTGT- GTTATATATAGACAGATC	Klonierung
OHP2_ΔC...R	GATCTGTCTATATATAACAACAACACTCTTA- ATTTTTGGGTTGGAAACC	Klonierung
OHP2_ΔC+stop_pET22b_XmaI.R	CCCGGGTTATTTGGGTTGGAAACCAAAAAAG	Klonierung
OHP2_ΔM.F	CTTCTCCGCCGCCGCCCAAAAAATGAGATCTC-CAATG	Klonierung
OHP2_ΔM.R	CATTGGAGATCTCATTTTTGGGCGGCGGCGG-AGAAG	Klonierung
OHP2_ΔProRS.F	GCTCTCAGACAGAAGGTCCTCAGAAAGCTGT- AGCTGTTG	Klonierung
OHP2_ΔProRS.R	CAACAGCTACAGCTTTCTGAGGACCTTCTGT- CTGAGAGC	Klonierung
OHP2_ΔProRS_pET22b_F_NdeI	CATATGTCTCAGACAGAAGGTCAGAAAGC	Klonierung
OHP2_pCAMBIA_BamHI.F	TGGATCCTGACCCATTGGAAGTTAAAAATTG	Klonierung
OHP2_pCAMBIA_DraIII.R	TCACTTTGTGCTGTACCACTCGGACCAATG	Klonierung
OHP2_SDM_AAA.F	AACTAACAAAAAATGTCAGTAGCTTCACCG	Klonierung
OHP2_SDM_AAA.R	GAACATCATATGGATATCCAAGTCTAGAATGCC	Klonierung
OHP2_pCAMstrep_XhoI.F	TCTCGAGATGTCAGTAGCTTCACCGATTCA	Klonierung
OHP2_pCAMstrep_XmaI.R	TCCCGGGTTCCAAGTCTAGAATGCCGAAA	Klonierung
OHP2+stop_pET22b_XmaI.R	CCCGGGTTATCCAAGTCTAGAATGCCG	Klonierung
tAPX_TMH_BamHI.F	GGATCCGAGCTTTCGGATTTCGATG	Klonierung
tAPX_TMH_XmaI.R	CCCGGGGAAACCAGAGAAATCGGAG	Klonierung
HCF244_qPCR1.F	TTCATGCAAGGTCTTATTGGTC	qPCR
HCF244_qPCR1.R	ACTTCTTGTGTTGTCCATGC	qPCR
HCF244_qPCR2.F	GGCCTTCTCAGAGGTTCTC	qPCR
HCF244_qPCR2.R	CTTATGAAGACACTACAAGGTCAG	qPCR
HCF244_qPCR3.F	CCGCTCAACTAGTTACACGT	qPCR
HCF244_qPCR3.R	ATGAGGATGAGGAAGATGGGA	qPCR
OHP1_qPCR1.F	GCACAACCCAAATCTCAACC	qPCR
OHP1_qPCR1.R	CCTTGTTTCAGAATCAGTTTCGAC	qPCR
OHP1_qPCR2.F	CGAACTGATTCTGAACAAGGG	qPCR
OHP1_qPCR2.R	GTTGGAAAGAACACAAACAGTG	qPCR
OHP2_qPCR1.F	CTTGAAGCTGCTGGTCAAGG	qPCR
OHP2_qPCR1.R	CATAGCCCACCTTCCATTGG	qPCR
OHP2_qPCR2.F	GGAAGGTGGGCTATGTTTGG	qPCR
OHP2_qPCR2.R	CAACAAGAAGAGGAATCGAAGAG	qPCR
OHP2_qPCR3.F	ATCACAGCCATCTTCCTCTC	qPCR
OHP2_qPCR3.R	AGTACTCTTGAAGCTCTTTAGCC	qPCR
SAND_qPCR.F	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	qPCR
SAND_qPCR.R	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	qPCR

5.4.5 Vektoren zur Proteinexpression

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Expressionsvektoren verwendet.

Vektor	Eigenschaft	Referenz
pET22b-cpSRP54	cpSRP54-CDS in pET22b, bp 226-1692	diese Arbeit
pET22b-LHCB1.1	LHCB1.1-CDS in pET22b, bp 106-801	diese Arbeit
pET22b-OHP1-WT	OHP1-CDS in pET22b, bp 121-330	diese Arbeit
pET22b-OHP1-AAA	OHP1-CDS in pET22b, SDM: bp 205-222 zu GCGa-tatggGGCtcaGCA	diese Arbeit
pET22b-OHP1-C76A	OHP1-CDS in pET22b, SDM: bp 226-228 zu GCC	diese Arbeit
pET22b-OHP2-WT	OHP2-CDS in pET22b, bp 127-516	diese Arbeit
pET22b-OHP2-AAA	OHP2-CDS in pET22b, SDM: bp 388-405 zu GCGatcttccGCTggaGCG	diese Arbeit
pET22b-OHP2-ΔC	OHP2-CDS in pET22b, bp 127-387	diese Arbeit
pET22b-OHP2-S54A	OHP2-CDS in pET22b, SDM: bp 160-162 zu GAC	diese Arbeit
pET22b-RIBA1	RIBA1-CDS in pET22b	HILTUNEN <i>et al.</i> 2012

5.4.6 Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung der Vektoren für die Pflanzentransformation bzw. Proteinexpression wurde die Phusion-Polymerase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben eingesetzt (98°C 15s, 35x[98°C 15s, 60-65°C 15s, 72°C 30s-60s], 72°C 5min). Die Annealingtemperaturen betrugen 60-65°C. Die verkürzten bzw. mutierten Sequenzen für die Komplementationsversuche wurden mittels *Overlap-Extension-PCR* erzeugt.

5.4.7 Restriktionsverdau

Ein präparativer Restriktionsverdau-Ansatz (40μl) enthielt 4μl 10x-Puffer, 10μl Plasmid-DNA und 0,8μl der Restriktionsenzyme. Die Ansätze wurden bei 37°C für 1 Stunde inkubiert, dann auf einem Agarosegel aufgetrennt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und das Fragment unter Verwendung des Invisorb Spin DNA Extraction Kits (Stratec) aus dem Gel eluiert.

5.4.8 Ligation

Ein 10μl-Ligationsansatz enthielt 1μl 10x-Puffer, 0,5μl T4-Ligase und 8,5μl Vektor + Fragment(e) (im Verhältnis Vektor:Fragment 1:3). Die Ansätze wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, durch Inkubation bei 65°C für 10 Minuten hitzeinaktiviert und anschließend zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt.

5.4.9 Erstellung der Vektoren für die Pflanzentransformation und Proteinexpression

Die PCR-Fragmente wurden zunächst in pJet1.2 (Thermo Scientific) ligiert, anschließend per Restriktionsverdau ausgeschnitten und in die Zielvektoren subkloniert. Für die Proteinexpression wurde der pET22b-Vektor (Novagen) verwendet, für die Pflanzentransformation pCAMstrepII bzw. pCAMBIA3301. Die Vektoren zur Komplementation der *ohp*-Mutanten unter Kontrolle der endogenen Promotoren enthielten die (mutierten)

CDS-Sequenzen eingebettet in ein 1000bp-Fragment *upstream* des Start-Codons sowie ein 500bp-Fragment nach dem Stop-Codon.

5.4.10 Transformation von *E. coli* und *Agrobacterium*

Chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen wurden mittels Hitzeschock transformiert: Zu einem Aliquot von 50µl Zellen wurde ein Ligationsansatz bzw. 1µl Plasmid-DNA gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Hitzeschocktransformation wurde durch Inkubation der Zellen bei 42°C im Wasserbad für exakt 90 Sekunden (DH5α) bzw. 45 Sekunden (Rosetta 2) durchgeführt. Anschließend wurde auf Eis für 2 Minuten inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 500µl LB-Medium. Die Zellen wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf Platten mit LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Agrobacterium wurde mittels Elektroporation wie folgt transformiert: 8µl der Zellen wurden auf Eis mit 1µl Plasmid für 5 Minuten inkubiert, dann in eine Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation in einem Elektroporator (Bio-Rad) durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend sofort in 500µl YEB resuspendiert und 2 Stunden bei 30°C inkubiert, bevor sie auf Platten mit YEB-Medium und den entsprechenden Antibiotika ausplattiert wurden.

5.4.11 Plasmid-DNA-Isolation mittels alkalischer Lyse

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli*-Zellen mittels alkalischer Lyse extrahiert: Eine 4ml-Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (15000rpm, 4°C, 1 Minute) und in 300µl Resuspendierungs-Puffer (50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A) aufgenommen. 300µl Lysispuffer (200mM NaOH, 1% SDS) wurde zugefügt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300µl Neutralisierungspuffer (3M Kaliumacetat pH 5,5) wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (15000rpm, 4°C, 10 Minuten). Der Überstand wurde mit dem 0,7-fachen des Volumens an Isopropanol gemischt und die DNA durch Zentrifugation pelletiert (15000rpm, 4°C, 10 Minuten). Das Pellet wurde zweimal in 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50µl Wasser gelöst.

5.4.12 RNA-Extraktion

Gesamt-RNA aus Blattmaterial wurde wie von OÑATE-SÁNCHEZ *et al.* (2008) beschrieben extrahiert: Pulverisiertes Blattmaterial wurde in Extraktionspuffer (68mM Natriumcitrat, 132mM Citronensäure, 1mM EDTA, 2% SDS) aufgenommen und mit einem Drittel des Volumens an DNA-Protein-Präzipitationspuffer (4M Natriumchlorid, 16mM Natriumcitrat, 32mM Citronensäure) gemischt. Nach Inkubation auf Eis für 10 Minuten wurde zentrifugiert (15000rpm, 4°C, 10 Minuten). Der Überstand wurde erneut zentrifugiert und anschließend mit einem Volumen Isopropanol gemischt. Die RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (15000rpm, 20°C, 5 Minuten) und zweimal in 75% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 25µl Wasser gelöst.

5.4.13 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden 1µg-Aliquots der extrahierten RNAs eingesetzt und zunächst DNase I-behandelt. Dazu wurden die RNA-Aliquots in 5µl-Ansätzen mit 0,5µl DNase I (Thermo Scientific) und 0,5µl Puffer versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Die RNA wurde anschließend mit RevertAid Reverser Transkriptase (Thermo Scientific) unter Verwendung von oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

5.4.14 qPCR-Analyse

Für die qPCR wurden die oben angeführten Primersequenzen eingesetzt. Ein 6µl-Reaktionsansatz enthielt 3µl SensiMixSYBR (Bioline), jeweils 0,25µl beider Primer und 1µl 1:50 verdünnter cDNA. Die qPCR-Analyse wurde in einem CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad) nach Herstellerangaben des Bioline-SYBR-Mixes durchgeführt (95°C 10min, 44x[95°C 15s, 60°C 15s, 72°C 15s], 95°C 10min, 64°C → 95°C in 0,5°C-Schritten je 5s), die Auswertung geschah nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (PFAFFL 2001) im Vergleich mit Referenzgenen.

5.5 Protein-Gelelektrophorese und Western Blot

5.5.1 SDS-PAGE und Tricin-SDS-PAGE

Gesamtproteinextrakte wurden wie folgt hergestellt: Pulverisiertes Blattmaterial wurde in SDS-PAGE-Probenpuffer (100mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 200mM DTT, 0,01% Bromphenolblau) aufgenommen (10µl/mg Frischgewicht) und die Proteine durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Proteinextrakte wurden in 12%-SDS-Gelen (mit 6M Harnstoff für die Detektion von Photosystem-Untereinheiten) nach LAEMMLI (1970) (Laufpuffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS) bzw. 10%-Tricin-SDS-Gelen (für die Detektion der OHPs) nach SCHÄGGER (2006) (Kathodenpuffer: 100mM Tris, 100mM Tricin, 0,1% SDS; Anodenpuffer: 100mM Tris-HCl pH 8,9) aufgetrennt. Sollten isolierte Thylakoide, Pulldown-Ansätze oder rekombinante Proteine analysiert werden, so wurden diese mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Als Größenmarker wurden PageRuler Unstained bzw. PageRuler Unstained LowRange (beide Thermo Scientific) eingesetzt.

5.5.2 BN-PAGE/CN-PAGE und 2D-SDS-PAGE

Native Gelelektrophoresen (BN-PAGE oder CN-PAGE) von solubilisierten Thylakoiden bzw. Rekonstitutionsansätzen wurden nach JÄRVI *et al.* (2011) bzw. PENG *et al.* (2009) durchgeführt. Dazu wurden selbst hergestellte 4%–12,5% Gradientengele eingesetzt. Die Solubilisierung von Thylakoiden wurde in 25BTH20G-Puffer bei einer Chl-Konzentration von 0,5–1,0µg/µl mit 1% DDM durch 10-minütige Inkubation auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde nicht-solubilisiertes Material pelletiert (15000rpm, 4°C, 10 Minuten). Die BN-PAGE-Proben wurden 1:10 mit Ladepuffer versetzt (100mM BisTris-HCl pH 7,0, 0,5M Amino-capronsäure, 30% Saccharose, 50mg/ml Serva Blue G) und Probenvolumina entsprechend 8–12µg Chl wurden geladen. Der Kathodenpuffer (50mM Tricin pH 7,0, 15mM BisTris) enthielt 0,02% Serva Blue G (Anodenpuffer: 50mM BisTris pH 7,0). Für die CN-PAGE wurden die Proben mit 0,3% DOC versetzt und die Elektrophorese mit 0,05% DOC sowie 0,06% DDM im Kathodenpuffer durchgeführt.

Für die Auftrennung in der 2. Dimension wurden Gelstreifen 30 Minuten in Denaturierungspuffer (38mM Tris-HCl pH 6,8, 6M Harnstoff, 4,3% SDS, 100mM DTT) inkubiert und anschließend horizontal auf SDS-Gele gelegt. Die Streifen wurden mit 1% Agarose (in Wasser) fixiert und die Proteine nach der Auftrennung geblottet.

5.5.3 Western Blot

Zum Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde die *semi-dry*-Variante des Western Blottings genutzt (TOWBIN *et al.* 1992). Der Transfer fand bei 0,8mA pro cm² Gelfläche auf Nitrocellulose-Membranen statt (Transferpuffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol). Die Inkubation mit Antikörpern geschah in TBS(T)-Puffer (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl; +0,1% Tween-20 im Fall von TBST; +2% Milchpulver für Blocking- und Antikörper-Lösungen). Für die Detektion der Western Blots

wurde Clarity ECL-Substrat (Biorad) verwendet und die Lumineszenz in einem Chemo Star Imager (Intas) aufgenommen. Die folgende Tabelle enthält die verwendeten Antikörper sowie deren Bezugsquelle.

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
α -ATPA (rabbit)	Agrisera	1:3000
α -CP43 (rabbit)	Agrisera	1:5000
α -Cyt b ₆ (rabbit)	Agrisera	1:5000
α -D1 (rabbit)	Agrisera	1:10000
α -ELIP1 (rabbit)	AG Adamska, Universität Konstanz	1:100
α -HA (mouse)	UBP-Bio	1:2000
α -HCF244 (rabbit)	LINK <i>et al.</i> 2012, eigene Aufreinigung	1:10
α -His-HRP	Thermo Scientific	1:1000
α -LHCA1 (rabbit)	Agrisera	1:5000
α -LHCB1 (rabbit)	Agrisera	1:5000
α -LIL3.1 (rabbit)	AG Adamska, Universität Konstanz	1:100
α -OHP1 (rabbit)	HEY <i>et al.</i> 2018a	1:100
α -OHP2 (rabbit)	HEY <i>et al.</i> 2018a	1:50
α -PsaA (rabbit)	Agrisera	1:5000
α -PsaL (rabbit)	Agrisera	1:5000
α -RPL4 (rabbit)	AG Schmitz-Linneweber, HU Berlin (Agrisera)	1:1000
α -mouse (goat)	Agrisera	1:20000
α -rabbit (goat)	Agrisera	1:20000

5.6 Pigmentextraktion und Quantifizierung

Gesamtpigmente wurden aus pulverisierten (und z.T. gefriergetrockneten) Blattproben durch Inkubation mit basischem Aceton (Aceton : 0,2N Ammoniumhydroxid, 9:1) extrahiert. Die Quantifizierung der Pigmente geschah mittels HPLC über den Vergleich mit reinen Standards.

5.7 Proteinbiochemische Methoden und Interaktionsassays

5.7.1 Isolation von Thylakoiden

Blattmaterial wurde in Extraktionspuffer (450mM Sorbitol, 20mM Tricin-KOH pH 8,4, 10mM EDTA, 0,1% BSA) homogenisiert, durch Miracloth (Millipore) filtriert und zentrifugiert (4000rpm, 4°C, 4 Minuten). Das Pellet wurde in Schock-Puffer (50mM HEPES-KOH pH 7,5, 5mM Sorbitol, 5mM Magnesiumchlorid) resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in einem kleinen Volumen 25BTH20G-Puffer (25mM BisTris pH 7,0, 20% Glycerin) aufgenommen.

5.7.2 Redoxassays

5.7.2.1 Redoxassay mit rekombinanten OHP-Proteinen

Rekombinant exprimierte OHP-Proteine (5µg) wurden in 25µl Assaypuffer (25mM Natriumphosphat, 150mM Natriumchlorid) mit oxidierenden (1mM H₂O₂, 50µM CuCl₂) bzw. reduzierenden (1mM DTT)

Reagenzien in den angegebenen Endkonzentrationen versetzt. Die Ansätze wurden 45 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde nichtreduzierender SDS-PAGE-Probenpuffer hinzugefügt und die Proteine durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten denaturiert.

5.7.2.2 Redoxassay mit Thylakoiden

Thylakoidmembranen wurden aus den angegebenen Linien isoliert und in Assaypuffer (0,1M Sucrose, 10mM HEPES-NaOH pH 8.0) aufgenommen. Anschließend wurden zu einer Thylakoidmembransuspension der Konzentration 0,25µg Chl/µl oxidierende (200mM Diamid, 10mM H₂O₂) bzw. reduzierende (100mM DTT) Reagenzien in den angegebenen Endkonzentrationen hinzugefügt und die Ansätze 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Nach Zentrifugation (15000rpm, 4°C, 5 Minuten) wurde der Überstand verworfen, das Membranpellet in nichtreduzierendem SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten denaturiert.

5.7.3 Phosphorylierungsassay

Der Phosphorylierungsassay wurde nach BELLAFIORE *et al.* (2005) durchgeführt: Unter Kurztagbedingungen (8h Licht, 100µmol Photonen s⁻¹ m⁻²) angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in Extraktionspuffer (50mM HEPES-KOH pH 7,6, 330mM Sorbitol, 5mM Magnesiumchlorid, 10mM Kaliumchlorid) homogenisiert, und die Chloroplasten durch Zentrifugation (5000rpm, 4°C, 10 Minuten) pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in Assaypuffer (50mM HEPES-KOH pH 7,6, 100mM Sorbitol, 5mM Magnesiumchlorid, 5mM Natriumchlorid, 0,4mM ATP) aufgenommen. Ein Reaktionsansatz (50µl) enthielt 5µg rekombinantes Protein, 10µg Chloroplasten/Thylakoide (bezogen auf die Proteinmenge) sowie 5µCi γ-³²P-ATP. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur im Schwachlicht (50µmol Photonen s⁻¹ m⁻²) bzw. in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde SDS-PAGE-Probenpuffer hinzugefügt und die Proteine durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten denaturiert.

5.7.4 Fraktionierung in lösliche und Membranfraktionen

Pulverisiertes Blattmaterial wurde in PBS-Puffer (137mM Natriumchlorid, 2,7mM Kaliumchlorid, 12mM Kaliumphosphat pH 7,6) mit 10µl Puffer pro mg Frischmasse resuspendiert. Durch Zentrifugation (15000rpm, 4°C, 15 Minuten) wurden die Membranen (Pellet) von den löslichen Proteinen getrennt (Überstand). Die Membranen wurden noch einmal in PBS resuspendiert und durch Zentrifugation wieder pelletiert. Nach diesem Waschschritt wurden beide Fraktionen mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten denaturiert.

5.7.5 His-Tag-Pulldown

Rekombinant exprimierte OHP-Proteine (100µg) wurden in Assaypuffer (50mM Natriumphosphat, 100mM Natriumchlorid, 10% Glycerin) mit 50µl Ni-NTA-Matrix (Thermo) 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Matrix dreimal mit Assaypuffer gewaschen und mit solubilisierten Thylakoiden inkubiert: Dazu wurden 100µl einer Thylakoidsuspension der Konzentration 1µg Chl/µl in Assaypuffer mit 0,5% DDM für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (15000rpm, 4°C, 10 Minuten). Der Überstand wurde zur Ni-NTA-Matrix mit den gebundenen OHP-Proteinen überführt und der Ansatz 2 Stunden bei 4°C rollend inkubiert. Dann wurde der Überstand verworfen und die Ni-NTA-Matrix viermal mit 1ml Assaypuffer + 0.1% DDM gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden abschließend durch Waschen der Ni-NTA-Matrix mit 50µl Elutionspuffer (Assaypuffer + 250mM Imidazol) eluiert.

5.7.6 Analyse der Interaktion rekombinanter Proteine mit dem plastidären Ribosom

5.7.6.1 Isolation von plastidären Ribosomen

Die Extraktion von plastidären Ribosomen aus 14 Tage alten, unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht, $100\mu\text{mol Photonen s}^{-1}\text{ m}^{-2}$) angezogenen *P. sativum*-Keimlingen geschah nach dem Protokoll von RIVERA *et al.* (2015): Das Pflanzenmaterial wurde in Extraktionspuffer (450mM Sorbitol, 20mM Tricin-KOH pH 8,0, 10mM EDTA, 0,1%BSA) homogenisiert, durch Miracloth filtriert und anschließend die Chloroplasten durch Zentrifugation (Rotor: JLA-16250, 1500rpm, 4°C, 5 Minuten) pelletiert. Durch Aufnahme des Pellets in Lysispuffer (100mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM Magnesiumacetat, 50mM Ammoniumchlorid, 6mM β -Mercaptoethanol) und mehrmaliges Aufziehen in eine Spritze durch eine enge Kanüle wurden die Chloroplastenmembranen aufgebrochen. Nach Zentrifugation (Rotor: SW40 Ti, 26000g, 4°C, 20 Minuten) wurde der Überstand im Verhältnis 1:1 auf ein Sucrosekissen (10mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM Magnesiumacetat, 150mM Kaliumchlorid, 6mM β -Mercaptoethanol, 1M Sucrose) überschichtet. Nach einer weiteren Zentrifugation (Rotor: SW40 Ti, 55000g, 4°C, 18 Stunden) wurde der gesamte Überstand verworfen und das Ribosomen-Pellet in einem kleinen Volumen Assaypuffer (50mM Kaliumphosphat pH 7,6, 100mM Natriumchlorid, 2% Glycerin) aufgenommen.

5.7.6.2 Interaktionsassay mittels Größenausschlusschromatographie

25 μg Ribosomen (bezogen auf die Proteinmenge) wurden in Assaypuffer (50mM Kaliumphosphat pH 7,6, 100mM Natriumchlorid, 2% Glycerin) mit einer äquivalenten Menge an rekombinantem Protein 1 Stunde bei 4°C vorinkubiert, und anschließend auf einer Superdex 200 Increase 3.2/300-Säule (2,4ml Säulenvolumen) mittels Äkta FPLC mit dem Assaypuffer als Laufpuffer aufgetrennt. Nach dem Durchfluss von 1ml wurden 14 Fraktionen von je 100 μl aufgefangen, mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und die Proteine durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten denaturiert.

5.7.7 Fixierung von Blattmaterial für die Elektronenmikroskopie

Blattmaterial der entsprechenden Linien wurde zwei Stunden nach Tagesbeginn im Licht geerntet und in Wasser mit einer Rasierklinge in 2x3mm große Stücke geschnitten. Diese wurden in Fixierpuffer (0,1M Natriumphosphat pH 7,4, 2,5% Glutaraldehyd, 4% Formaldehyd) überführt und mittels Vakuumbehandlung in einem Exsikkator mit angeschlossener Vakuumpumpe mit dem Fixierpuffer infiltriert. Dafür wurde das Vakuum angezogen und nach wenigen Minuten wieder abgelassen. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt, bis die Blattstücke zum Boden des Reaktionsgefäßes absanken. Die weitere Aufarbeitung der Proben (Färbung mit Osmiumtetroxid und Einbettung) sowie die Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder wurden von Prof. Dr. Stefan Geimer und Reinhild Rothe an der Universität Bayreuth durchgeführt.

5.7.8 Rekonstitution von rekombinanten Proteinen mit Pigmenten

Die Rekonstitution der rekombinanten Proteine mit Pigmenten geschah exakt nach dem Protokoll von NATALI *et al.* (2014). Zunächst wurden wie in der Veröffentlichung beschrieben Gesamtpigmente sowie Carotinoide aus jungen *S. oleracea*-Blättern extrahiert. Auch die Isolation von *Inclusion Bodies* aus LHCB1.1-Proteine überexprimierenden *E. coli*-Zellen wurde exakt wie beschrieben durchgeführt.

5.7.8.1 Isolation von Membranfraktionen aus *E. coli*

Da sich die OHP-Proteine nach der Überexpression in *E. coli* nicht in *Inclusion Bodies* befanden, musste das Protokoll für eine Anreicherung von die OHPs enthaltenden Membranfraktionen angepasst werden: Ein *E. coli*-Zellpellet aus einem 250ml-Überexpressionsansatz wurde in 4ml Lysispuffer (50mM Natriumphosphat, 300mM Natriumchlorid) resuspendiert und mit 100µl Lysozym (10µg/µl Stocklösung) versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden 20µl DNaseI (NEB), 8µl RNase (Thermo), 40µl Magnesiumchlorid (1M Stocklsg.) und 40µl Natriumchlorid (1M Stocklsg.) hinzugefügt und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde eine 5-minütige Ultraschallbehandlung durchgeführt. Die Lösung wurde zentrifugiert (10000rpm, 4°C, 10 Minuten), der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) durch zweimalige, je 5-sekündige Ultraschallbehandlung resuspendiert. Dieser Waschschrift des Pellets mit TE-Puffer wurde wiederholt und das Pellet abschließend in 500µl TE-Puffer resuspendiert.

5.7.8.2 Rekonstitution und His-Tag-Aufreinigung

Für die Rekonstitution wurden 800µg Protein (800µg LHCB1.1 bzw. 270µg OHP1 + 530µg OHP2, d.h. gleiche Stoffmengen) in 400µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) mit 400µl 2x-Rekonstitutionspuffer (200mM HEPES, 5% Sucrose, 4% LDS, 2mM Benzamidin, 10mM Aminohexansäure) und 0,6µl β -Mercaptoethanol versetzt, und durch Inkubation bei 100°C für 1 Minute denaturiert. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und mit 500µg Gesamtpigmenten + 80µg Carotinoiden in insgesamt 30µl 100%igem Ethanol versetzt. Direkt im Anschluss wurden 94µl OG (20% Stocklsg.) hinzugefügt und auf Eis für 10 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 90µl Kaliumchlorid (2M Stocklsg.) wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin 10 Minuten bei 15000rpm zentrifugiert (4°C).

Eine Ni-NTA-Säule (HisTrap HP, 1ml, GE) wurde mit 10ml OG-Puffer (20mM HEPES pH 7,5, 200mM Natriumchlorid, 12,5% Sucrose, 10mM Imidazol, 1% OG) äquilibriert. Im Anschluss wurde der Überstand des Rekonstitutionsansatzes in 5ml OG-Puffer suspendiert und auf die Säule geladen (Flussrate stets ca. 1ml/Minute). Die Säule wurde nach der Beladung mit den rekonstituierten Komplexen erst mit 5ml OG-Puffer und daraufhin mit 3ml OG-Waschpuffer (40mM HEPES pH 8,0, 200mM Natriumchlorid, 0,06% DDM) gespült. Die gebundenen Komplexe wurden dann mit Elutionspuffer (40mM HEPES pH 8,0, 200mM Natriumchlorid, 500mM Imidazol, 0,06% DDM) eluiert. Dabei wurden üblicherweise 500µl Eluat aufgefangen.

5.7.8.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden in einem F-7000-Fluoreszenzspektrophotometer (Hitachi) aufgenommen. Dabei wurden die in den Abbildungslegenden beschriebenen Exzitations- und Emissionwellenlängen verwendet.

5.7.9 Lichtstress-Assay

Der Lichtstress-Assay mit Blattscheiben wurde exakt wie in HEY *et al.* (2018b) beschrieben durchgeführt.

Literatur

- ADAMSKA, I., K. KLOPPSTECH & I. OHAD (1992). „UV light stress induces the synthesis of the early light-inducible protein and prevents its degradation“. In: *The Journal of biological chemistry* 267.34, S. 24732–24737.
- ADAMSKA, I., E. KRUSE & K. KLOPPSTECH (2001). „Stable insertion of the early light-induced proteins into etioplast membranes requires chlorophyll a“. In: *The Journal of biological chemistry* 276.11, S. 8582–8587. doi: 10.1074/jbc.M010447200.
- ADAMSKA, I., M. ROOBOL-BÓZA, M. LINDAHL & B. ANDERSSON (1999). „Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea“. In: *European journal of biochemistry* 260.2, S. 453–460. issn: 0014-2956.
- AHMED, T., Z. YIN & S. BHUSHAN (2017). *Structure of the large subunit of the chloro-ribosome*. doi: 10.2210/pdb5H1S/pdb.
- AHN, T. K., T. J. AVENSON, M. BALLOTTARI, Y.-C. CHENG, K. K. NIYOGI, R. BASSI & G. R. FLEMING (2008). „Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein“. In: *Science (New York, N.Y.)* 320.5877, S. 794–797. doi: 10.1126/science.1154800..
- ALBUS, C. A., S. RUF, M. A. SCHÖTTLER, W. LEIN, J. KEHR & R. BOCK (2010). „Y3IP1, a nucleus-encoded thylakoid protein, cooperates with the plastid-encoded Ycf3 protein in photosystem I assembly of tobacco and Arabidopsis“. In: *The Plant cell* 22.8, S. 2838–2855. issn: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.110.073908.
- ALLEN, J. F., J. BENNETT, K. E. STEINBACK & C. J. ARNTZEN (1981). „Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems“. In: *Nature* 291.5810, S. 25–29. doi: 10.1038/291025a0.
- ANBUDURAI, P. R., T. S. MOR, I. OHAD, S. V. SHESTAKOV & H. B. PAKRASI (1994). „The ctpA gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91.17, S. 8082–8086. issn: 0027-8424.
- ANDERSSON, B. & E.-M. ARO (2004). „Photodamage and D1 Protein Turnover in Photosystem II“. In: *Regulation of Photosynthesis*. Hrsg. von E.-M. ARO & B. ANDERSSON. Bd. 11. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, S. 377–393. isbn: 0-7923-6332-9. doi: 10.1007/0-306-48148-0{textunderscore}22.
- ANDERSSON, U., M. HEDDAD & I. ADAMSKA (2003). „Light stress-induced one-helix protein of the chlorophyll a/b-binding family associated with photosystem I“. In: *Plant physiology* 132.2, S. 811–820. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.102.019281.
- APITZ, J., K. NISHIMURA, J. SCHMIED, A. WOLF, B. HEDTKE, K. J. VAN WIJK & B. GRIMM (2016). „Posttranslational Control of ALA Synthesis Includes GluTR Degradation by Clp Protease and Stabilization by GluTR-Binding Protein“. In: *Plant physiology* 170.4, S. 2040–2051. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.15.01945.
- ARMBRUSTER, U., J. ZÜHLKE, B. RENGSTL, R. KRELLER, E. MAKARENKO, T. RÜHLE, D. SCHÜNEMANN, P. JAHNS, B. WEISSHAAR, J. NICKELSEN & D. LEISTER (2010). „The Arabidopsis thylakoid protein PAM68 is required for efficient D1 biogenesis and photosystem II assembly“. In: *The Plant cell* 22.10, S. 3439–3460. issn: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.110.077453.
- ARMSTRONG, G. A., S. RUNGE, G. FRICK, U. SPERLING & K. APEL (1995). „Identification of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis thaliana“. In: *Plant physiology* 108.4, S. 1505–1517. issn: 0032-0889.
- ARO, E.-M., I. VIRGIN & B. ANDERSSON (1993). „Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1143.2, S. 113–134. issn: 00052728. doi: 10.1016/0005-2728(93)90134-2.
- ARONSSON, H., C. SUNDQVIST, M. P. TIMKO & C. DAHLIN (2001). „The importance of the C-terminal region and Cys residues for the membrane association of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase in pea“. In: *FEBS letters* 502.1-2, S. 11–15. issn: 0014-5793.
- ARONSSON, H., C. SUNDQVIST & C. DAHLIN (2003). „POR hits the road: import and assembly of a plastid protein“. In: *Plant molecular biology* 51.1, S. 1–7. issn: 0167-4412.
- BAILEY, S., E. THOMPSON, P. J. NIXON, P. HORTON, C. W. MULLINEAUX, C. ROBINSON & N. H. MANN (2002). „A critical role for the Var2 FtsH homologue of Arabidopsis thaliana in the photosystem II repair cycle in vivo“. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.3, S. 2006–2011. issn: 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M105878200.
- BAO, H. & R. L. BURNAP (2016). „Photoactivation: The Light-Driven Assembly of the Water Oxidation Complex of Photosystem II“. In: *Frontiers in Plant Science* 7, S. 578. doi: 10.3389/fpls.2016.00578.

- BECK, J., J. N. LOHSCHIEDER, S. ALBERT, U. ANDERSSON, K. W. MENDGEN, M. C. ROJAS-STÜTZ, I. ADAMSKA & D. FUNCK (2017). „Small One-Helix Proteins Are Essential for Photosynthesis in Arabidopsis“. In: *Frontiers in Plant Science* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00007.
- BELGIO, E., P. UNGERER & A. V. RUBAN (2015). „Light-harvesting superstructures of green plant chloroplasts lacking photosystems“. In: *Plant, cell & environment* 38.10, S. 2035–2047. doi: 10.1111/pce.12528.
- BELLAFIORE, S., F. BARNECHE, G. PELTIER & J.-D. ROCHAIX (2005). „State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7“. In: *Nature* 433.7028, S. 892–895. doi: 10.1038/nature03286.
- BEN-SHEM, A., F. FROLOW & N. NELSON (2003). „Crystal structure of plant photosystem I“. In: *Nature* 426.6967, S. 630–635. doi: 10.1038/nature02200.
- BHUIYAN, N. H., G. FRISO, A. POLIAKOV, L. PONNALA & K. J. VAN WIJK (2015). „MET1 is a thylakoid-associated TPR protein involved in photosystem II supercomplex formation and repair in Arabidopsis“. In: *The Plant cell* 27.1, S. 262–285. issn: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.114.132787.
- BLOCK, M. A., A. K. TEWARI, C. ALBRIEUX, E. MARÉCHAL & J. JOYARD (2002). „The plant S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes“. In: *European journal of biochemistry* 269.1, S. 240–248. issn: 0014-2956.
- BOEHM, M., J. YU, V. REISINGER, M. BECKOVA, L. A. EICHACKER, E. SCHLODDER, J. KOMENDA & P. J. NIXON (2012). „Subunit composition of CP43-less photosystem II complexes of Synechocystis sp. PCC 6803: implications for the assembly and repair of photosystem II“. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367.1608, S. 3444–3454. doi: 10.1098/rstb.2012.0066.
- BOEKEMA, E. J., H. VAN ROON, J. F. L. VAN BREEMEN & J. P. DEKKER (1999). „Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes“. In: *European journal of biochemistry* 266.2, S. 444–452. issn: 0014-2956. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00876.x.
- BOHNE, A.-V., S. SCHWENKERT, B. GRIMM & J. NICKELSEN (2016). „Roles of Tetratricopeptide Repeat Proteins in Biogenesis of the Photosynthetic Apparatus“. In: *International review of cell and molecular biology* 324, S. 187–227. issn: 1937-6448. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.01.005.
- BONARDI, V., P. PESARESI, T. BECKER, E. SCHLEIFF, R. WAGNER, T. PFANNNSCHMIDT, P. JAHNS & D. LEISTER (2005). „Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases“. In: *Nature* 437.7062, S. 1179–1182. doi: 10.1038/nature04016.
- BOUDREAU, E., Y. TAKAHASHI, C. LEMIEUX, M. TURMEL & J. D. ROCHAIX (1997). „The chloroplast ycf3 and ycf4 open reading frames of Chlamydomonas reinhardtii are required for the accumulation of the photosystem I complex“. In: *The EMBO Journal* 16.20, S. 6095–6104. issn: 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/16.20.6095.
- BRÉHÉLIN, C. & F. KESSLER (2008). „The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks“. In: *Photochemistry and photobiology* 84.6, S. 1388–1394. issn: 0031-8655. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00459.x.
- BRZEZOWSKI, P., A. S. RICHTER & B. GRIMM (2015). „Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1847.9, S. 968–985. issn: 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.05.007.
- BUCHANAN, B. B. & S. LUAN (2005). „Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research“. In: *Journal of experimental botany* 56.416, S. 1439–1447. issn: 0022-0957. doi: 10.1093/jxb/eri158.
- BÜCHEL, C. (2015). „Evolution and function of light harvesting proteins“. In: *Journal of plant physiology* 172, S. 62–75. doi: 10.1016/j.jp1ph.2014.04.018.
- BUČINSKÁ, L., É. KISS, P. KONÍK, J. KNOPPOVÁ, J. KOMENDA & R. SOBOTKA (2018). „The Ribosome-Bound Protein Pam68 Promotes Insertion of Chlorophyll into the CP47 Subunit of Photosystem II“. In: *Plant physiology* 176.4, S. 2931–2942. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.18.00061.
- BUSCH, A. & M. HIPPLER (2011). „The structure and function of eukaryotic photosystem I“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1807.8, S. 864–877. issn: 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.09.009.
- CAFFARRI, S., T. TIBILETTI, R. JENNINGS & S. SANTABARBARA (2014). „A Comparison Between Plant Photosystem I and Photosystem II Architecture and Functioning“. In: *Current Protein & Peptide Science* 15.4, S. 296–331. issn: 13892037. doi: 10.2174/1389203715666140327102218.
- CAI, W., J. MA, W. CHI, M. ZOU, J. GUO, C. LU & L. ZHANG (2010). „Cooperation of LPA3 and LPA2 is essential for photosystem II assembly in Arabidopsis“. In: *Plant physiology* 154.1, S. 109–120. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.110.159558.

- CAI, W., J. MA, J. GUO & L. ZHANG (2008). „Function of ROC4 in the efficient repair of photodamaged photosystem II in *Arabidopsis*“. In: *Photochemistry and photobiology* 84.6, S. 1343–1348. ISSN: 0031-8655. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00448.x.
- CAO, P., X. SU, X. PAN, Z. LIU, W. CHANG & M. LI (2018). „Structure, assembly and energy transfer of plant photosystem II supercomplex“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859.9, S. 633–644. ISSN: 00052728. DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.03.007.
- CASAZZA, A. P., S. ROSSINI, M. G. ROSSO & C. SOAVE (2005). „Mutational and expression analysis of ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis thaliana*“. In: *Plant molecular biology* 58.1, S. 41–51. ISSN: 0167-4412. DOI: 10.1007/s11103-005-4090-1.
- CHEN, M., Y. CHOI, D. F. VOYTAS & S. RODERMEL (2000). „Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 22.4, S. 303–313. ISSN: 0960-7412.
- CHIDGEY, J. W., M. LINHARTOVÁ, J. KOMENDA, P. J. JACKSON, M. J. DICKMAN, D. P. CANNIFFE, P. KONÍK, J. PILNÝ, C. N. HUNTER & R. SOBOTKA (2014). „A cyanobacterial chlorophyll synthase-HliD complex associates with the Ycf39 protein and the YidC/Alb3 insertase“. In: *The Plant cell* 26.3, S. 1267–1279. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.114.124495.
- CHOW, K. S., D. P. SINGH, A. R. WALKER & A. G. SMITH (1998). „Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: mapping, expression and subcellular targeting of the precursor proteins“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 15.4, S. 531–541. ISSN: 0960-7412.
- CORREA-GALVIS, V., G. POSCHMANN, M. MELZER, K. STÜHLER & P. JAHNS (2016). „PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in *Arabidopsis*“. In: *Nature plants* 2, S. 15225. DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.225.
- „CORRECTION“ (2018). In: *The Plant cell* 30.1, S. 245–248. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.17.00803.
- CROCE, R., T. MOROSINOTTO, S. CASTELLETTI, J. BRETON & R. BASSI (2002). „The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1556.1, S. 29–40. ISSN: 0006-3002.
- CROOKS, G. E., G. HON, J.-M. CHANDONIA & S. E. BRENNER (2004). „WebLogo: a sequence logo generator“. In: *Genome research* 14.6, S. 1188–1190. ISSN: 1088-9051. DOI: 10.1101/gr.849004.
- CZARNECKI, O., B. HEDTKE, M. MELZER, M. ROTHBART, A. RICHTER, Y. SCHRÖTER, T. PFANNSCHMIDT & B. GRIMM (2011). „An *Arabidopsis* GluTR binding protein mediates spatial separation of 5-aminolevulinic acid synthesis in chloroplasts“. In: *The Plant cell* 23.12, S. 4476–4491. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.111.086421.
- DA, Q., P. WANG, M. WANG, T. SUN, H. JIN, B. LIU, J. WANG, B. GRIMM & H.-B. WANG (2017). „Thioredoxin and NADPH-Dependent Thioredoxin Reductase C Regulation of Tetrapyrrole Biosynthesis“. In: *Plant physiology* 175.2, S. 652–666. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.16.01500.
- DASGUPTA, J., G. M. ANANYEV & G. C. DISMUKES (2008). „Photoassembly of the Water-Oxidizing Complex in Photosystem II“. In: *Coordination chemistry reviews* 252.3-4, S. 347–360. ISSN: 0010-8545. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.08.022.
- DAVIS, S. J., J. KUREPA & R. D. VIERSTRA (1999). „The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96.11, S. 6541–6546. ISSN: 0027-8424.
- DAY, I. S., M. GOLOVKIN & A. S. REDDY (1998). „Cloning of the cDNA for glutamyl-tRNA synthetase from *Arabidopsis thaliana*“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1399.2-3, S. 219–224. ISSN: 0006-3002.
- DOBÁKOVÁ, M., R. SOBOTKA, M. TICHÝ & J. KOMENDA (2009). „Psb28 protein is involved in the biogenesis of the photosystem II inner antenna CP47 (PsbB) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803“. In: *Plant physiology* 149.2, S. 1076–1086. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.108.130039.
- DROZDETSKIY, A., C. COLE, J. PROCTER & G. J. BARTON (2015). „JPred4: a protein secondary structure prediction server“. In: *Nucleic acids research* 43.W1, W389–94. ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gkv332.
- EICHACKER, L. A., M. HELFRICH, W. RÜDIGER & B. MÜLLER (1996). „Stabilization of Chlorophyll a-binding Apoproteins P700, CP47, CP43, D2, and D1 by Chlorophyll a or Zn-pheophytin a“. In: *Journal of Biological Chemistry* 271.50, S. 32174–32179. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.271.50.32174.
- ENGELKEN, J., H. BRINKMANN & I. ADAMSKA (2010). „Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily“. In: *BMC evolutionary biology* 10, S. 233. DOI: 10.1186/1471-2148-10-233.

- ERMAKOVA-GERDES, S. & W. VERMAAS (1999). „Inactivation of the open reading frame slr0399 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 functionally complements mutations near the Q(A) niche of photosystem II. A possible role of Slr0399 as a chaperone for quinone binding“. In: *The Journal of biological chemistry* 274.43, S. 30540–30549.
- ESPINEDA, C. E., A. S. LINFORD, D. DEVINE & J. A. BRUSSLAN (1999). „The AtCAO gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in *Arabidopsis thaliana*“. In: *Plant physiology* 96.18, S. 10507–10511. issn: 0032-0889. doi: 10.1073/pnas.96.18.10507.
- FAN, M., M. LI, Z. LIU, P. CAO, X. PAN, H. ZHANG, X. ZHAO, J. ZHANG & W. CHANG (2015). „Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants“. In: *Nature structural & molecular biology* 22.9, S. 729–735. doi: 10.1038/nsmb.3068.
- FENG, W.-K., L. WANG, Y. LU & X.-Y. WANG (2011). „A protein oxidase catalysing disulfide bond formation is localized to the chloroplast thylakoids“. In: *The FEBS journal* 278.18, S. 3419–3430. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08265.x.
- FORDE, B. G. & P. J. LEA (2007). „Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling“. In: *Journal of experimental botany* 58.9, S. 2339–2358. issn: 0022-0957. doi: 10.1093/jxb/erm121.
- FRANCK, F., U. SPERLING, G. FRICK, B. POCHERT, B. VAN CLEVE, K. APEL & G. A. ARMSTRONG (2000). „Regulation of Etioplast Pigment-Protein Complexes, Inner Membrane Architecture, and Protochlorophyllide a Chemical Heterogeneity by Light-Dependent NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases A and B“. In: *Plant physiology* 124.4, S. 1678–1696. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.124.4.1678.
- FRICK, G., Q. SU, K. APEL & G. A. ARMSTRONG (2003). „An *Arabidopsis* porB porC double mutant lacking light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 35.2, S. 141–153. issn: 0960-7412.
- FRISTEDT, R., A. HERDEAN, C. E. BLABY-HAAS, F. MAMEDOV, S. S. MERCHANT, R. L. LAST & B. LUNDIN (2015). „PHOTO-SYSTEM II PROTEIN33, a protein conserved in the plastid lineage, is associated with the chloroplast thylakoid membrane and provides stability to photosystem II supercomplexes in *Arabidopsis*“. In: *Plant physiology* 167.2, S. 481–492. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.114.253336.
- FRISTEDT, R., R. WILLIAMS-CARRIER, S. S. MERCHANT & A. BARKAN (2014). „A thylakoid membrane protein harboring a DnaJ-type zinc finger domain is required for photosystem I accumulation in plants“. In: *The Journal of biological chemistry* 289.44, S. 30657–30667. doi: 10.1074/jbc.M114.587758.
- FUJITA, Y. & C. E. BAUER (2000). „Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified bchl and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme“. In: *The Journal of biological chemistry* 275.31, S. 23583–23588. doi: 10.1074/jbc.M002904200.
- FUNK, C. & W. VERMAAS (1999). „A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants“. In: *Biochemistry* 38.29, S. 9397–9404. issn: 0006-2960. doi: 10.1021/bi990545.
- GALETSKIY, D. N., J. N. LOHSCHIEDER, A. S. KONONIKHIN, O. N. KHARYBIN, I. A. POPOV, I. ADAMSKA & E. N. NIKOLAEV (2011). „Light stress photodynamics of chlorophyll-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membranes revealed by high-resolution mass spectrometric studies“. In: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 37.1, S. 105–118. issn: 1068-1620. doi: 10.1134/S1068162011010079.
- GAO, J., H. WANG, Q. YUAN & Y. FENG (2018). „Structure and Function of the Photosystem Supercomplexes“. In: *Frontiers in Plant Science* 9, S. 357. doi: 10.3389/fpls.2018.00357.
- GARCÍA-CERDÁN, J. G., L. KOVÁCS, T. TÓTH, S. KEREÏCHE, E. ASEVA, E. J. BOEKEMA, F. MAMEDOV, C. FUNK & W. P. SCHRÖDER (2011). „The PsbW protein stabilizes the supramolecular organization of photosystem II in higher plants“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65.3, S. 368–381. issn: 0960-7412. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04429.x.
- GEERTZ-HANSEN, H. M., N. BLOM, A. M. FEIST, S. BRUNAK & T. N. PETERSEN (2014). „Cofactory: sequence-based prediction of cofactor specificity of Rossmann folds“. In: *Proteins* 82.9, S. 1819–1828. doi: 10.1002/prot.24536.
- GÖHRE, V., F. OSSENBUHL, M. CRÈVECOEUR, L. A. EICHACKER & J.-D. ROCHAIX (2006). „One of two alb3 proteins is essential for the assembly of the photosystems and for cell survival in *Chlamydomonas*“. In: *The Plant cell* 18.6, S. 1454–1466. issn: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.105.038695.
- HAHN, A., J. VONCK, D. J. MILLS, T. MEIER & W. KÜHLBRANDT (2018). „Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase“. In: *Science (New York, N.Y.)* 360.6389. doi: 10.1126/science.aat4318.
- HAUSSÜHL, K., B. ANDERSSON & I. ADAMSKA (2001). „A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II“. In: *The EMBO Journal* 20.4, S. 713–722. issn: 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/20.4.713.

- HE, Q., N. DOLGANOV, O. BJORKMAN & A. R. GROSSMAN (2001). „The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803. Expression and function in high light“. In: *The Journal of biological chemistry* 276.1, S. 306–314. doi: 10.1074/jbc.M008686200.
- HE, Q. & W. VERMAAS (1998). „Chlorophyll a availability affects psbA translation and D1 precursor processing in vivo in *Synechocystis* sp. PCC 6803“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.10, S. 5830–5835. issn: 0027-8424.
- HEAZLEWOOD, J. L., P. DUREK, J. HUMMEL, J. SELBIG, W. WECKWERTH, D. WALTHER & W. X. SCHULZE (2008). „PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor“. In: *Nucleic acids research* 36.Database issue, S. D1015–21. issn: 0305-1048. doi: 10.1093/nar/gkm812.
- HEDDAD, M. & I. ADAMSKA (2000). „Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll a/b-binding gene family“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.7, S. 3741–3746. issn: 0027-8424.
- HENRY, R., R. L. GOFORTH & D. SCHÜNEMANN (2007). „Chloroplast SRP/FtsY and Alb3 in Protein Integration into the Thylakoid Membrane“. In: *Molecular Machines Involved in Protein Transport across Cellular Membranes*. Bd. 25. The Enzymes. Elsevier, S. 493–521. isbn: 9780123739162. doi: 10.1016/S1874-6047(07)25019-X.
- HEY, D. & B. GRIMM (2018a). „ONE-HELIX PROTEIN 2 (OHP2) is required for the stability of OHP1 and assembly factor HCF244 and is functionally linked to PSII biogenesis“. In: *Plant physiology* 177.4, S. 1453–1472. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.18.00540.
- HEY, D. & B. GRIMM (2018b). „Requirement of ONE-HELIX PROTEIN 1 (OHP1) in early *Arabidopsis* seedling development and under high light intensity“. In: *Plant signaling & behavior* e1550317, S. 1–3. doi: 10.1080/15592324.2018.1550317.
- HEY, D., M. ROTHBART, J. HERBST, P. WANG, J. MULLER, D. WITTMANN, K. GRUHL & B. GRIMM (2017). „LIL3, a Light-Harvesting Complex Protein, Links Terpenoid and Tetrapyrrole Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*“. In: *Plant physiology* 174.2, S. 1037–1050. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.17.00505.
- HEYES, D. J. & C. N. HUNTER (2005). „Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase“. In: *Trends in biochemical sciences* 30.11, S. 642–649. issn: 0968-0004. doi: 10.1016/j.tibs.2005.09.001.
- HILTUNEN, H.-M., B. ILLARIONOV, B. HEDTKE, M. FISCHER & B. GRIMM (2012). „*Arabidopsis* RIBA proteins: two out of three isoforms have lost their bifunctional activity in riboflavin biosynthesis“. In: *International journal of molecular sciences* 13.11, S. 14086–14105. doi: 10.3390/ijms131114086.
- HUANG, W., Q. CHEN, Y. ZHU, F. HU, L. ZHANG, Z. MA, Z. HE & J. HUANG (2013). „*Arabidopsis* thylakoid formation 1 is a critical regulator for dynamics of PSII-LHCII complexes in leaf senescence and excess light“. In: *Molecular plant* 6.5, S. 1673–1691. issn: 1674-2052. doi: 10.1093/mp/sst069.
- HUTIN, C., L. NUSSAUME, N. MOISE, I. MOYA, K. KLOPPSTECH & M. HAVAUX (2003). „Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.8, S. 4921–4926. issn: 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0736939100.
- ILAG, L. L., A. M. KUMAR & D. SÖLL (1994). „Light regulation of chlorophyll biosynthesis at the level of 5-aminolevulinic acid formation in *Arabidopsis*“. In: *The Plant cell* 6.2, S. 265–275. issn: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.6.2.265.
- IVLEVA, N. B., S. V. SHESTAKOV & H. B. PAKRASI (2000). „The carboxyl-terminal extension of the precursor D1 protein of photosystem II is required for optimal photosynthetic performance of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803“. In: *Plant physiology* 124.3, S. 1403–1412. issn: 0032-0889.
- JANSSON, S., J. ANDERSSON, S. J. KIM & G. JACKOWSKI (2000). „An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins“. In: *Plant molecular biology* 42.2, S. 345–351. issn: 0167-4412.
- JÄRVI, S., M. SUORSA & E.-M. ARO (2015). „Photosystem II repair in plant chloroplasts—Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1847.9, S. 900–909. issn: 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.01.006.
- JÄRVI, S., M. SUORSA, V. PAAKKARINEN & E.-M. ARO (2011). „Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes“. In: *Biochemical Journal* 439.2, S. 207–214. issn: 0264-6021. doi: 10.1042/BJ20102155.
- JENSEN, P. E., R. BASSI, E. J. BOEKEMA, J. P. DEKKER, S. JANSSON, D. LEISTER, C. ROBINSON & H. V. SCHELLER (2007). „Structure, function and regulation of plant photosystem I“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1767.5, S. 335–352. issn: 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbabi.2007.03.004.
- JIN, H., M. FU, Z. DUAN, S. DUAN, M. LI, X. DONG, B. LIU, D. FENG, J. WANG, L. PENG & H.-B. WANG (2018). „LOW PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY 1 is required for light-regulated photosystem II biogenesis in *Arabidopsis*“. In:

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115.26, E6075–E6084. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1807364115.
- JIN, H., B. LIU, L. LUO, D. FENG, P. WANG, J. LIU, Q. DA, Y. HE, K. QI, J. WANG & H.-B. WANG (2014). „HYPERSENSITIVE TO HIGH LIGHT1 interacts with LOW QUANTUM YIELD OF PHOTOSYSTEM III1 and functions in protection of photosystem II from photodamage in Arabidopsis“. In: *The Plant cell* 26.3, S. 1213–1229. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.113.122424.
- JOHNSON, L. N. (2009). „The regulation of protein phosphorylation“. In: *Biochemical Society transactions* 37.Pt 4, S. 627–641. ISSN: 0300-5127. DOI: 10.1042/BST0370627.
- JOHNSON, M. P. (2016). „Photosynthesis“. In: *Essays in biochemistry* 60.3, S. 255–273. DOI: 10.1042/EBC20160016.
- JOHNSON, M. P. & A. V. RUBAN (2010). „Arabidopsis plants lacking PsbS protein possess photoprotective energy dissipation“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61.2, S. 283–289. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2009.04051.x.
- KACZOR, C. M., M. W. SMITH, I. SANGWAN & M. R. O'BRIAN (1994). „Plant delta-aminolevulinic acid dehydratase. Expression in soybean root nodules and evidence for a bacterial lineage of the Alad gene“. In: *Plant physiology* 104.4, S. 1411–1417. ISSN: 0032-0889.
- KANEKO, T., L. LI & S. S.-C. LI (2008). „The SH3 domain—a family of versatile peptide- and protein-recognition module“. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, S. 4938–4952. ISSN: 1093-9946.
- KANG, Z.-H. & G.-X. WANG (2016). „Redox regulation in the thylakoid lumen“. In: *Journal of plant physiology* 192, S. 28–37. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.12.012.
- KAPRI-PARDES, E., L. NAVEH & Z. ADAM (2007). „The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in Arabidopsis“. In: *The Plant cell* 19.3, S. 1039–1047. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.106.046573.
- KATO, Y., T. KOUSO & W. SAKAMOTO (2012). „Variegated tobacco leaves generated by chloroplast FtsH suppression: implication of FtsH function in the maintenance of thylakoid membranes“. In: *Plant & cell physiology* 53.2, S. 391–404. DOI: 10.1093/pcp/pcr189.
- KATO, Y., E. MIURA, K. IDO, K. IFUKU & W. SAKAMOTO (2009). „The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species“. In: *Plant physiology* 151.4, S. 1790–1801. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.109.146589.
- KATO, Y. & W. SAKAMOTO (2018). „FtsH Protease in the Thylakoid Membrane: Physiological Functions and the Regulation of Protease Activity“. In: *Frontiers in Plant Science* 9, S. 855. DOI: 10.3389/fpls.2018.00855.
- KAUSS, D., S. BISCHOF, S. STEINER, K. APEL & R. MESKAUSKIENE (2012). „FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg(++)-branch of this pathway“. In: *FEBS letters* 586.3, S. 211–216. ISSN: 0014-5793. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.12.029.
- KELLEY, L. A., S. MEZULIS, C. M. YATES, M. N. WASS & M. J. E. STERNBERG (2015). „The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis“. In: *Nature protocols* 10.6, S. 845–858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- KIRCHHOFF, H. (2014). „Structural changes of the thylakoid membrane network induced by high light stress in plant chloroplasts“. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369.1640, S. 20130225. DOI: 10.1098/rstb.2013.0225.
- KLIMMEK, F., A. SJÖDIN, C. NOUTSOS, D. LEISTER & S. JANSSON (2006). „Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants“. In: *Plant physiology* 140.3, S. 793–804. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.105.073304.
- KLINKERT, B., F. OSSENBUHL, M. SIKORSKI, S. BERRY, L. EICHACKER & J. NICKELSEN (2004). „PratA, a periplasmic tetratricopeptide repeat protein involved in biogenesis of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803“. In: *The Journal of biological chemistry* 279.43, S. 44639–44644. DOI: 10.1074/jbc.M405393200.
- KNOPPOVÁ, J., R. SOBOTKA, M. TICHÝ, J. YU, P. KONIK, P. HALADA, P. J. NIXON & J. KOMENDA (2014). „Discovery of a chlorophyll binding protein complex involved in the early steps of photosystem II assembly in *Synechocystis*“. In: *The Plant cell* 26.3, S. 1200–1212. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.114.123919.
- KOCH, M., C. BREITHAUPT, R. KIEFERSAUER, J. FREIGANG, R. HUBER & A. MESSERSCHMIDT (2004). „Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis“. In: *The EMBO Journal* 23.8, S. 1720–1728. ISSN: 0261-4189. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600189.

- KOCHI, T., K. MUKOUGAWA, N. FRANKENBERG, M. MASUDA, A. YOKOTA & J. C. LAGARIAS (2001). „The Arabidopsis HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase“. In: *The Plant cell* 13.2, S. 425–436. ISSN: 1040-4651.
- KOMENDA, J., J. KNOPPOVÁ, J. KOPEČNÁ, R. SOBOTKA, P. HALADA, J. YU, J. NICKELSEN, M. BOEHM & P. J. NIXON (2012a). „The Psb27 assembly factor binds to the CP43 complex of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803“. In: *Plant physiology* 158.1, S. 476–486. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.111.184184.
- KOMENDA, J., J. NICKELSEN, M. TICHÝ, O. PRÁŠIL, L. A. EICHACKER & P. J. NIXON (2008). „The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803“. In: *Journal of Biological Chemistry* 283.33, S. 22390–22399. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M801917200.
- KOMENDA, J., V. REISINGER, B. C. MÜLLER, M. DOBÁKOVÁ, B. GRANVOGL & L. A. EICHACKER (2004). „Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis* PCC 6803“. In: *The Journal of biological chemistry* 279.47, S. 48620–48629. DOI: 10.1074/jbc.M405725200.
- KOMENDA, J. & R. SOBOTKA (2016). „Cyanobacterial high-light-inducible proteins–Protectors of chlorophyll-protein synthesis and assembly“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1857.3, S. 288–295. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.08.011.
- KOMENDA, J., R. SOBOTKA & P. J. NIXON (2012b). „Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria“. In: *Current opinion in plant biology* 15.3, S. 245–251. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.01.017.
- KRECH, K., H.-Y. FU, W. THIELE, S. RUF, M. A. SCHÖTTLER & R. BOCK (2013). „Reverse genetics in complex multigene operons by co-transformation of the plastid genome and its application to the open reading frame previously designated psbN“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 75.6, S. 1062–1074. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/tpj.12256.
- KÜHLBRANDT, W., D. N. WANG & Y. FUJIYOSHI (1994). „Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography“. In: *Nature* 367.6464, S. 614–621. DOI: 10.1038/367614a0.
- KURISU, G., H. ZHANG, J. L. SMITH & W. A. CRAMER (2003). „Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity“. In: *Science (New York, N.Y.)* 302.5647, S. 1009–1014. DOI: 10.1126/science.1090165.
- LAEMMLI, U. K. (1970). „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4“. In: *Nature* 227.5259, S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- LARKIN, R. M., J. M. ALONSO, J. R. ECKER & J. CHORY (2003). „GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling“. In: *Science (New York, N.Y.)* 299.5608, S. 902–906. DOI: 10.1126/science.1079978.
- LEHTIMÄKI, N., M. M. KOSKELA & P. MULO (2015). „Posttranslational Modifications of Chloroplast Proteins: An Emerging Field“. In: *Plant physiology* 168.3, S. 768–775. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.15.00117.
- LEMAIRE, S. D., L. MICHELET, M. ZAFFAGNINI, V. MASSOT & E. ISSAKIDIS-BOURGUET (2007). „Thioredoxins in chloroplasts“. In: *Current genetics* 51.6, S. 343–365. ISSN: 0172-8083. DOI: 10.1007/s00294-007-0128-z.
- LI, X. P., O. BJÖRKMAN, C. SHIH, A. R. GROSSMAN, M. ROSENQUIST, S. JANSSON & K. K. NIYOGI (2000). „A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting“. In: *Nature* 403.6768, S. 391–395. DOI: 10.1038/35000131.
- LI, X.-P., A. M. GILMORE, S. CAFFARRI, R. BASSI, T. GOLAN, D. KRAMER & K. K. NIYOGI (2004). „Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein“. In: *The Journal of biological chemistry* 279.22, S. 22866–22874. DOI: 10.1074/jbc.M402461200.
- LI, Y., B. LIU, J. ZHANG, F. KONG, L. ZHANG, H. MENG, W. LI, J.-D. ROCHAIX, D. LI & L. PENG (2018). „OHP1, OHP2, and HCF244 form a transient functional complex with the photosystem II reaction center“. In: *Plant physiology*. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.18.01231.
- LIN, Y.-P., T.-Y. LEE, A. TANAKA & Y.-Y. CHANG (2014). „Analysis of an Arabidopsis heat-sensitive mutant reveals that chlorophyll synthase is involved in reutilization of chlorophyllide during chlorophyll turnover“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 80.1, S. 14–26. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/tpj.12611.
- LINK, S., K. ENGELMANN, K. MEIERHOFF & P. WESTHOFF (2012). „The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the psbA mRNA of Arabidopsis“. In: *Plant physiology* 160.4, S. 2202–2218. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.112.205104.

- LIU, J. & R. L. LAST (2015). „MPH1 is a thylakoid membrane protein involved in protecting photosystem II from photodamage in land plants“. In: *Plant signaling & behavior* 10.10, e1076602. doi: 10.1080/15592324.2015.1076602.
- LIU, J., H. YANG, Q. LU, X. WEN, F. CHEN, L. PENG, L. ZHANG & C. LU (2012). „PsbP-domain protein1, a nuclear-encoded thylakoid lumenal protein, is essential for photosystem I assembly in Arabidopsis“. In: *The Plant cell* 24.12, S. 4992–5006. ISSN: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.112.106542.
- LIU, Z., H. YAN, K. WANG, T. KUANG, J. ZHANG, L. GUI, X. AN & W. CHANG (2004). „Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution“. In: *Nature* 428, S. 287–292. doi: 10.1038/nature02373. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02373>.
- LLANSOLA-PORTOLES, M. J., R. SOBOTKA, E. KISH, M. K. SHUKLA, A. A. PASCAL, T. POLIVKA & B. ROBERT (2017). „Twisting a beta-Carotene, an Adaptive Trick from Nature for Dissipating Energy during Photoprotection“. In: *The Journal of biological chemistry* 292.4, S. 1396–1403. doi: 10.1074/jbc.M116.753723.
- LOHSCHIEDER, J. N., M. C. ROJAS-STÜTZ, M. ROTHBART, U. ANDERSSON, D. FUNCK, K. MENDGEN, B. GRIMM & I. ADAMSKA (2015). „Altered levels of LIL3 isoforms in Arabidopsis lead to disturbed pigment-protein assembly and chlorophyll synthesis, chlorotic phenotype and impaired photosynthetic performance“. In: *Plant, cell & environment* 38.10, S. 2115–2127. doi: 10.1111/pce.12540.
- LU, Y. (2016). „Identification and Roles of Photosystem II Assembly, Stability, and Repair Factors in Arabidopsis“. In: *Frontiers in Plant Science* 7, S. 168. doi: 10.3389/fpls.2016.00168.
- LU, Y., D. A. HALL & R. L. LAST (2011). „A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in Arabidopsis thaliana“. In: *The Plant cell* 23.5, S. 1861–1875. ISSN: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.111.085456.
- LU, Y., H.-R. WANG, H. LI, H.-R. CUI, Y.-G. FENG & X.-Y. WANG (2013). „A chloroplast membrane protein LTO1/AtVKOR involving in redox regulation and ROS homeostasis“. In: *Plant cell reports* 32.9, S. 1427–1440. doi: 10.1007/s00299-013-1455-9.
- MA, J., L. PENG, J. GUO, Q. LU, C. LU & L. ZHANG (2007). „LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in Arabidopsis thaliana“. In: *The Plant cell* 19.6, S. 1980–1993. ISSN: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.107.050526.
- MADSEN, O., L. SANDAL, N. N. SANDAL & K. A. MARCKER (1993). „A soybean coproporphyrinogen oxidase gene is highly expressed in root nodules“. In: *Plant molecular biology* 23.1, S. 35–43. ISSN: 0167-4412.
- MASUDA, T., N. FUSADA, N. OOSAWA, K. TAKAMATSU, Y. Y. YAMAMOTO, M. OHTO, K. NAKAMURA, K. GOTO, D. SHIBATA, Y. SHIRANO, H. HAYASHI, T. KATO, S. TABATA, H. SHIMADA, H. OHTA & K.-i. TAKAMIYA (2003). „Functional analysis of isoforms of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in Arabidopsis thaliana“. In: *Plant & cell physiology* 44.10, S. 963–974.
- MAZOR, Y., A. BOROVIKOVA, I. CASPY & N. NELSON (2017). „Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution“. In: *Nature plants* 3, S. 17014. doi: 10.1038/nplants.2017.14.
- MESKAUSKIENE, R., M. NATER, D. GOSLINGS, F. KESSLER, R. OP DEN CAMP & K. APEL (2001). „FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis thaliana“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.22, S. 12826–12831. ISSN: 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.221252798.
- MESKAUSKIENE, R. & K. APEL (2002). „Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU“. In: *FEBS letters* 532.1-2, S. 27–30. ISSN: 0014-5793.
- MEURER, J., H. PLÜCKEN, K. V. KOWALLIK & P. WESTHOFF (1998). „A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in Arabidopsis thaliana“. In: *The EMBO Journal* 17.18, S. 5286–5297. ISSN: 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/17.18.5286.
- MEURER, J., K. MEIERHOFF & P. WESTHOFF (1996). „Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of Arabidopsis thaliana and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridisation“. In: *Planta* 198.3, S. 385–396. ISSN: 0032-0935. doi: 10.1007/BF00620055.
- MICHALSKA, J., H. ZAUBER, B. B. BUCHANAN, F. J. CEJUDO & P. GEIGENBERGER (2009). „NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.24, S. 9908–9913. ISSN: 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0903559106.
- MOCHIZUKI, N., J. A. BRUSSLAN, R. LARKIN, A. NAGATANI & J. CHORY (2001). „Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.4, S. 2053–2058. ISSN: 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.98.4.2053.

- MOCK, H. P., L. TRAINOTTI, E. KRUSE & B. GRIMM (1995). „Isolation, sequencing and expression of cDNA sequences encoding uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco and barley“. In: *Plant molecular biology* 28.2, S. 245–256. ISSN: 0167-4412.
- MOORE, T. S. (2018). *Lipid Metabolism in Plants*. 1st ed. Milton: CRC Press. ISBN: 9781315894973. URL: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=5257246>.
- MORK-JANSSON, A. E. & L. A. EICHACKER (2018). „Characterization of chlorophyll binding to LIL3“. In: *PLoS ONE* 13.2. DOI: 10.1371/journal.pone.0192228.
- MORK-JANSSON, A. E., D. GARGANO, K. KMIEC, C. FURNES, D. SHEVELA & L. A. EICHACKER (2015a). „Lil3 dimerization and chlorophyll binding in *Arabidopsis thaliana*“. In: *FEBS letters* 589.20 Pt B, S. 3064–3070. ISSN: 0014-5793. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.08.023.
- MORK-JANSSON, A., A. K. BUE, D. GARGANO, C. FURNES, V. REISINGER, J. ARNOLD, K. KMIEC & L. A. EICHACKER (2015b). „Lil3 Assembles with Proteins Regulating Chlorophyll Synthesis in Barley“. In: *PLoS ONE* 10.7, e0133145. DOI: 10.1371/journal.pone.0133145.
- MOSER, J., W.-D. SCHUBERT, V. BEIER, I. BRINGEMEIER, D. JAHN & D. W. HEINZ (2001). „V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis“. In: *The EMBO Journal* 20.23, S. 6583–6590. ISSN: 0261-4189. DOI: 10.1093/emboj/20.23.6583.
- MOUMMOU, H., Y. KALLBERG, L. B. TONFACK, B. PERSSON & B. VAN DER REST (2012). „The plant short-chain dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns“. In: *BMC plant biology* 12, S. 219. DOI: 10.1186/1471-2229-12-219.
- MURANAKA, A., S. WATANABE, A. SAKAMOTO & H. SHIMADA (2012). „*Arabidopsis* cotyledon chloroplast biogenesis factor CYO1 uses glutathione as an electron donor and interacts with PSI (A1 and A2) and PSII (CP43 and CP47) subunits“. In: *Journal of plant physiology* 169.12, S. 1212–1215. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.04.001.
- MURCHIE, E. H. & T. LAWSON (2013). „Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications“. In: *Journal of experimental botany* 64.13, S. 3983–3998. ISSN: 0022-0957. DOI: 10.1093/jxb/ert208..
- MYOUGA, F., K. TAKAHASHI, R. TANAKA, N. NAGATA, A. Z. KISS, C. FUNK, Y. NOMURA, H. NAKAGAMI, S. JANSSON & K. SHINOZAKI (2018). „Stable Accumulation of Photosystem II Requires ONE-HELIX PROTEIN1 (OHP1) of the Light Harvesting-Like Family1OPEN“. In: *Plant physiology* 176.3, S. 2277–2291. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.17.01782.
- NACIR, H. & C. BRÉHÉLIN (2013). „When proteomics reveals unsuspected roles: the plastoglobule example“. In: *Frontiers in Plant Science* 4, S. 114. DOI: 10.3389/fpls.2013.00114.
- NAGATA, N., R. TANAKA & A. TANAKA (2007). „The major route for chlorophyll synthesis includes 3,8-divinyl-chlorophyllide a reduction in *Arabidopsis thaliana*“. In: *Plant & cell physiology* 48.12, S. 1803–1808. DOI: 10.1093/pcp/pcm153.
- NAKANISHI, H., H. NOZUE, K. SUZUKI, Y. KANEKO, G. TAGUCHI & N. HAYASHIDA (2005). „Characterization of the *Arabidopsis thaliana* mutant pcb2 which accumulates divinyl chlorophylls“. In: *Plant & cell physiology* 46.3, S. 467–473. DOI: 10.1093/pcp/pci053.
- NATALI, A., L. M. ROY & R. CROCE (2014). „In vitro reconstitution of light-harvesting complexes of plants and green algae“. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* 92, e51852. DOI: 10.3791/51852.
- NICKELSEN, J. & B. RENGSTL (2013). „Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants“. In: *Annual review of plant biology* 64, S. 609–635. ISSN: 1543-5008. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120124.
- NIEDZWIEDZKI, D. M., T. TRONINA, H. LIU, H. STALEVA, J. KOMENDA, R. SOBOTKA, R. E. BLANKENSHIP & T. POLÍVKA (2016). „Carotenoid-induced non-photochemical quenching in the cyanobacterial chlorophyll synthase-HliC/D complex“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1857.9, S. 1430–1439. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbabio.2016.04.280.
- NISHIMURA, K., Y. ASAKURA, G. FRISO, J. KIM, S.-H. OH, H. RUTSCHOW, L. PONNALA & K. J. VAN WIJK (2013). „ClpS1 is a conserved substrate selector for the chloroplast Clp protease system in *Arabidopsis*“. In: *The Plant cell* 25.6, S. 2276–2301. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.113.112557.
- NISHIMURA, K., Y. KATO & W. SAKAMOTO (2016). „Chloroplast Proteases: Updates on Proteolysis within and across Suborganellar Compartments“. In: *Plant physiology* 171.4, S. 2280–2293. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.16.00330.
- OBAYASHI, T., Y. AOKI, S. TADAKA, Y. KAGAYA & K. KINOSHITA (2018). „ATTED-II in 2018: A Plant Coexpression Database Based on Investigation of the Statistical Property of the Mutual Rank Index“. In: *Plant & cell physiology* 59.1, e3. DOI: 10.1093/pcp/pcx191..

- OLINARES, P. D. B., J. KIM & K. J. VAN WIJK (2011). „The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1807.8, S. 999–1011. issn: 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.12.003.
- OLIVER, R. P. & W. T. GRIFFITHS (1982). „Pigment-protein complexes of illuminated etiolated leaves“. In: *Plant physiology* 70.4, S. 1019–1025. issn: 0032-0889.
- OÑATE-SÁNCHEZ, L. & J. VICENTE-CARBAJOSA (2008). „DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques“. In: *BMC research notes* 1, S. 93. doi: 10.1186/1756-0500-1-93.
- OOSAWA, N., T. MASUDA, K. AWAI, N. FUSADA, H. SHIMADA, H. OHTA & K. TAKAMIYA (2000). „Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*“. In: *FEBS letters* 474.2-3, S. 133–136. issn: 0014-5793.
- OSTER, U., C. E. BAUER & W. RÜDIGER (1997). „Characterization of chlorophyll a and bacteriochlorophyll a synthases by heterologous expression in *Escherichia coli*“. In: *The Journal of biological chemistry* 272.15, S. 9671–9676.
- PAN, X., M. LI, T. WAN, L. WANG, C. JIA, Z. HOU, X. ZHAO, J. ZHANG & W. CHANG (2011). „Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach“. In: *Nature structural & molecular biology* 18.3, S. 309–315. doi: 10.1038/nsmb.2008.
- PENG, L., Y. FUKAO, M. FUJIWARA, T. TAKAMI & T. SHIKANAI (2009). „Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*“. In: *The Plant cell* 21.11, S. 3623–3640. issn: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.109.068791.
- PENG, L., J. MA, W. CHI, J. GUO, S. ZHU, Q. LU, C. LU & L. ZHANG (2006). „LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*“. In: *The Plant cell* 18.4, S. 955–969. issn: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.105.037689.
- PERSSON, B., Y. KALLBERG, J. E. BRAY, E. BRUFORD, S. L. DELLAPORTA, A. D. FAVIA, R. G. DUARTE, H. JÖRNVALL, K. L. KAVANAGH, N. KEDISHVILI, M. KISIELA, E. MASER, R. MINDNICH, S. ORCHARD, T. M. PENNING, J. M. THORNTON, J. ADAMSKI & U. OPPERMAN (2009). „The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative“. In: *Chemico-biological interactions* 178.1-3, S. 94–98. doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.040.
- PETER, E. & B. GRIMM (2009). „GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis“. In: *Molecular plant* 2.6, S. 1198–1210. issn: 1674-2052. doi: 10.1093/mp/ssp072.
- PFAFFL, M. W. (2001). „A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR“. In: *Nucleic acids research* 29.9, e45. issn: 0305-1048.
- PLÜCKEN, H., B. MÜLLER, D. GROHMANN, P. WESTHOFF & L. A. EICHACKER (2002). „The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*“. In: *FEBS letters* 532.1-2, S. 85–90. issn: 0014-5793.
- POGORYELOV, D., C. REICHEN, A. L. KLYSZEJKO, R. BRUNISHOLZ, D. J. MULLER, P. DIMROTH & T. MEIER (2007). „The oligomeric state of c rings from cyanobacterial F-ATP synthases varies from 13 to 15“. In: *Journal of bacteriology* 189.16, S. 5895–5902. issn: 0021-9193. doi: 10.1128/JB.00581-07.
- PONTIER, D., C. ALBRIEUX, J. JOYARD, T. LAGRANGE & M. A. BLOCK (2007). „Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in *Arabidopsis*. Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling“. In: *The Journal of biological chemistry* 282.4, S. 2297–2304. doi: 10.1074/jbc.M610286200.
- PRIBIL, M., M. LABS & D. LEISTER (2014). „Structure and dynamics of thylakoids in land plants“. In: *Journal of experimental botany* 65.8, S. 1955–1972. issn: 0022-0957. doi: 10.1093/jxb/eru090.
- PROCTOR, M. S., J. W. CHIDGEY, M. K. SHUKLA, P. J. JACKSON, R. SOBOTKA, C. N. HUNTER & A. HITCHCOCK (2018). „Plant and algal chlorophyll synthases function in *Synechocystis* and interact with the YidC/Alb3 membrane insertase“. In: *FEBS letters* 592.18, S. 3062–3073. issn: 0014-5793. doi: 10.1002/1873-3468.13222.
- PROMNARES, K., J. KOMENDA, L. BUMBA, J. NEBESAROVA, F. VACHA & M. TICHY (2006). „Cyanobacterial small chlorophyll-binding protein ScpD (HliB) is located on the periphery of photosystem II in the vicinity of PsbH and CP47 subunits“. In: *The Journal of biological chemistry* 281.43, S. 32705–32713. doi: 10.1074/jbc.M606360200.
- REISINGER, V., M. PLÖSCHER & L. A. EICHACKER (2008). „Lil3 assembles as chlorophyll-binding protein complex during deetiolation“. In: *FEBS letters* 582.10, S. 1547–1551. issn: 0014-5793. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.042.
- „RETRACTION“ (2016). In: *The Plant cell* 28.12, S. 3061. issn: 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.16.00881.
- „RETRACTION: Vol. 154: 109-120, 2010“ (2017). In: *Plant physiology* 173.2, S. 1526. issn: 0032-0889. doi: 10.1104/pp.16.01908.

- RICHTER, A. S., E. PETER, M. ROTHBART, H. SCHLICHE, J. TOIVOLA, E. RINTAMÄKI & B. GRIMM (2013). „Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis“. In: *Plant physiology* 162.1, S. 63–73. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.113.217141.
- RICHTER, A. S., P. WANG & B. GRIMM (2016a). „Arabidopsis Mg-Protoporphyrin IX Methyltransferase Activity and Redox Regulation Depend on Conserved Cysteines“. In: *Plant & cell physiology* 57.3, S. 519–527. DOI: 10.1093/pcp/pcw007.
- RICHTER, A. S., C. HOCHHEUSER, C. FUFZAN, L. HEINZE, F. KUHNERT & B. GRIMM (2016b). „Phosphorylation of GENOMES UNCOUPLED 4 Alters Stimulation of Mg Chelatase Activity in Angiosperms“. In: *Plant physiology* 172.3, S. 1578–1595. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.16.01036.
- RIVERA, M. C., B. MAGUIRE & J. A. LAKE (2015). „Isolation of ribosomes and polysomes“. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2015.3, S. 293–299. DOI: 10.1101/pdb.prot081331.
- ROCHAIX, J.-D. (2011). „Regulation of photosynthetic electron transport“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1807.3, S. 375–383. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.11.010.
- ROKKA, A., E. M. ARO, R. G. HERRMANN, B. ANDERSSON & A. V. VENER (2000). „Dephosphorylation of photosystem II reaction center proteins in plant photosynthetic membranes as an immediate response to abrupt elevation of temperature“. In: *Plant physiology* 123.4, S. 1525–1536. ISSN: 0032-0889.
- ROOSE, J. L. & H. B. PAKRASI (2004). „Evidence that D1 processing is required for manganese binding and extrinsic protein assembly into photosystem II“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.44, S. 45417–45422. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M408458200.
- ROSSINI, S., A. P. CASAZZA, E. C. M. ENGELMANN, M. HAVAUX, R. C. JENNINGS & C. SOAVE (2006). „Suppression of both ELIP1 and ELIP2 in Arabidopsis does not affect tolerance to photoinhibition and photooxidative stress“. In: *Plant physiology* 141.4, S. 1264–1273. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.106.083055.
- SAMOL, I., A. SHAPIGUZOV, B. INGELSSON, G. FUCILE, M. CRÈVECOEUR, A. V. VENER, J.-D. ROCHAIX & M. GOLDSCHMIDT-CLERMONT (2012). „Identification of a photosystem II phosphatase involved in light acclimation in Arabidopsis“. In: *The Plant cell* 24.6, S. 2596–2609. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.112.095703.
- SCHÄGGER, H. (2006). „Tricine-SDS-PAGE“. In: *Nature protocols* 1.1, S. 16–22. DOI: 10.1038/nprot.2006.4.
- SCHMIED, J., Z. HOU, B. HEDTKE & B. GRIMM (2018). „Controlled partitioning of glutamyl-tRNA reductase in stroma- and membrane-associated fractions affects the synthesis of 5-amino levulinic acid“. In: *Plant & cell physiology*. DOI: 10.1093/pcp/pcy143.
- SCHNEIDER, A., I. STEINBERGER, H. STRISSEL, H.-H. KUNZ, N. MANAVSKI, J. MEURER, G. BURKHARD, S. JARZOMBSKI, D. SCHÜNEMANN, S. GEIMER, U.-I. FLÜGGE & D. LEISTER (2014). „The Arabidopsis Tellurite resistance C protein together with ALB3 is involved in photosystem II protein synthesis“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 78.2, S. 344–356. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/tpj.12474.
- SCHOTTKOWSKI, M., J. RATKE, U. OSTER, M. NOWACZYK & J. NICKELSEN (2009). „Pitt, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in light-dependent chlorophyll biosynthesis and thylakoid membrane biogenesis in Synechocystis sp. PCC 6803“. In: *Molecular plant* 2.6, S. 1289–1297. ISSN: 1674-2052. DOI: 10.1093/mp/ssp075.
- SCHÖTTLER, M. A., C. A. ALBUS & R. BOCK (2011). „Photosystem I: its biogenesis and function in higher plants“. In: *Journal of plant physiology* 168.12, S. 1452–1461. DOI: 10.1016/j.jp1ph.2010.12.009.
- SCHRÖDINGER, L. L. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8*.
- SCHULT, K., K. MEIERHOFF, S. PARADIES, T. TÖLLER, P. WOLFF & P. WESTHOFF (2007). „The nuclear-encoded factor HCF173 is involved in the initiation of translation of the psbA mRNA in Arabidopsis thaliana“. In: *The Plant cell* 19.4, S. 1329–1346. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.106.042895.
- SCHÜNEMANN, D. (2004). „Structure and function of the chloroplast signal recognition particle“. In: *Current genetics* 44.6, S. 295–304. ISSN: 0172-8083. DOI: 10.1007/s00294-003-0450-z.
- SCHWENKERT, S., D. J. A. NETZ, J. FRAZZON, A. J. PIERIK, E. BILL, J. GROSS, R. LILL & J. MEURER (2009). „Chloroplast HCF101 is a scaffold protein for 4Fe-4S cluster assembly“. In: *Biochemical Journal* 425.1, S. 207–214. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/BJ20091290.
- SELSTAM, E., J. SCHELIN, W. P. WILLIAMS & A. P. R. BRAIN (2007). „Structural organisation of prolamellar bodies (PLB) isolated from Zea mays. Parallel TEM, SAXS and absorption spectra measurements on samples subjected to freeze-thaw, reduced pH and high-salt perturbation“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1768.9, S. 2235–2245. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbame.2007.05.005.

- SERRATO, A. J., J. M. PÉREZ-RUIZ, M. C. SPÍNOLA & F. J. CEJUDO (2004). „A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*“. In: *The Journal of biological chemistry* 279.42, S. 43821–43827. DOI: 10.1074/jbc.M404696200.
- SHALYGO, N., O. CZARNECKI, E. PETER & B. GRIMM (2009). „Expression of chlorophyll synthase is also involved in feedback-control of chlorophyll biosynthesis“. In: *Plant molecular biology* 71.4-5, S. 425–436. ISSN: 0167-4412. DOI: 10.1007/s11103-009-9532-8.
- SHEN, G., J. ZHAO, S. K. REIMER, M. L. ANTONKINE, Q. CAI, S. M. WEILAND, J. H. GOLBECK & D. A. BRYANT (2002). „Assembly of photosystem I. I. Inactivation of the rubA gene encoding a membrane-associated rubredoxin in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 causes a loss of photosystem I activity“. In: *The Journal of biological chemistry* 277.23, S. 20343–20354. DOI: 10.1074/jbc.M201103200.
- SHI, L.-X. & W. P. SCHRÖDER (2004). „The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1608.2-3, S. 75–96. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbabi.2003.12.004.
- SHIKANAI, T. (2014). „Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis“. In: *Current opinion in biotechnology* 26, S. 25–30. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.08.012.
- SHUKLA, M. K., M. J. LLANSOLA-PORTOLES, M. TICHY, A. A. PASCAL, B. ROBERT & R. SOBOTKA (2018). „Binding of pigments to the cyanobacterial high-light-inducible protein HliC“. In: *Photosynthesis research* 137.1, S. 29–39. DOI: 10.1007/s11120-017-0475-7.
- SIEVERS, F., A. WILM, D. DINEEN, T. J. GIBSON, K. KARPLUS, W. LI, R. LOPEZ, H. MCWILLIAM, M. REMMERT, J. SÖDING, J. D. THOMPSON & D. G. HIGGINS (2011). „Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega“. In: *Molecular systems biology* 7, S. 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- SIRPIÖ, S., Y. ALLAHVERDIYEVA, M. SUORSA, V. PAAKKARINEN, J. VAINONEN, N. BATTCHIKOVA & E.-M. ARO (2007). „TLP18.3, a novel thylakoid lumen protein regulating photosystem II repair cycle“. In: *Biochemical Journal* 406.3, S. 415–425. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/BJ20070460.
- SJÖGREN, L. L. E., T. M. MACDONALD, S. SUTINEN & A. K. CLARKE (2004). „Inactivation of the clpC1 gene encoding a chloroplast Hsp100 molecular chaperone causes growth retardation, leaf chlorosis, lower photosynthetic activity, and a specific reduction in photosystem content“. In: *Plant physiology* 136.4, S. 4114–4126. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.104.053835.
- SMITH, A. G., M. A. SANTANA, A. D. WALLACE-COOK, J. M. ROPER & R. LABBE-BOIS (1994). „Isolation of a cDNA encoding chloroplast ferrochelatase from *Arabidopsis thaliana* by functional complementation of a yeast mutant“. In: *The Journal of biological chemistry* 269.18, S. 13405–13413.
- SOBOTKA, R., M. TICHY, A. WILDE & C. N. HUNTER (2011). „Functional assignments for the carboxyl-terminal domains of the ferrochelatase from *Synechocystis* PCC 6803: the CAB domain plays a regulatory role, and region II is essential for catalysis“. In: *Plant physiology* 155.4, S. 1735–1747. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.110.167528.
- SONOIKE, K. (2011). „Photoinhibition of photosystem I“. In: *Physiologia Plantarum* 142.1, S. 56–64. ISSN: 0031-9317. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01437.x.
- STALEVA, H., J. KOMENDA, M. K. SHUKLA, V. SLOUF, R. KANA, T. POLIVKA & R. SOBOTKA (2015). „Mechanism of photoprotection in the cyanobacterial ancestor of plant antenna proteins“. In: *Nature chemical biology* 11.4, S. 287–291. ISSN: 1552-4450. DOI: 10.1038/nchembio.1755.
- STENGEL, A., I. L. GÜGEL, D. HILGER, B. RENGSTL, H. JUNG & J. NICKELSEN (2012). „Initial steps of photosystem II de novo assembly and preloading with manganese take place in biogenesis centers in *Synechocystis*“. In: *The Plant cell* 24.2, S. 660–675. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.111.093914.
- SUN, X., T. FU, N. CHEN, J. GUO, J. MA, M. ZOU, C. LU & L. ZHANG (2010a). „The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*“. In: *Plant physiology* 152.3, S. 1263–1273. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.109.150722.
- SUN, X., M. OUYANG, J. GUO, J. MA, C. LU, Z. ADAM & L. ZHANG (2010b). „The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem-II assembly in *Arabidopsis thaliana*“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62.2, S. 240–249. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2010.04140.x.
- SUNDQVIST, C. & C. DAHLIN (1997). „With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes“. In: *Physiologia Plantarum* 100.4, S. 748–759. ISSN: 0031-9317. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb00002.x.
- TAKAHASHI, K., A. TAKABAYASHI, A. TANAKA & R. TANAKA (2014). „Functional analysis of light-harvesting-like protein 3 (LIL3) and its light-harvesting chlorophyll-binding motif in *Arabidopsis*“. In: *The Journal of biological chemistry* 289.2, S. 987–999. DOI: 10.1074/jbc.M113.525428.

- TAN, F.-C., Q. CHENG, K. SAHA, I. U. HEINEMANN, M. JAHN, D. JAHN & A. G. SMITH (2008). „Identification and characterization of the Arabidopsis gene encoding the tetrapyrrole biosynthesis enzyme uroporphyrinogen III synthase“. In: *Biochemical Journal* 410.2, S. 291–299. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/BJ20070770.
- TANAKA, R., K. KOBAYASHI & T. MASUDA (2011). „Tetrapyrrole Metabolism in Arabidopsis thaliana“. In: *The arabidopsis book* 9, e0145. DOI: 10.1199/tab.0145.
- TANAKA, R., M. ROTHBART, S. OKA, A. TAKABAYASHI, K. TAKAHASHI, M. SHIBATA, F. MYOUGA, R. MOTOHASHI, K. SHINOZAKI, B. GRIMM & A. TANAKA (2010). „LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107.38, S. 16721–16725. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1004699107.
- TANAKA, R. & A. TANAKA (2007). „Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants“. In: *Annual review of plant biology* 58, S. 321–346. ISSN: 1543-5008. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105448.
- TANAKA, OSTER, KRUSE, RUDIGER & GRIMM (1999). „Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase“. In: *Plant physiology* 120.3, S. 695–704. ISSN: 0032-0889.
- THEIS, J. & M. SCHRODA (2016). „Revisiting the photosystem II repair cycle“. In: *Plant signaling & behavior* 11.9, e1218587. DOI: 10.1080/15592324.2016.1218587.
- TOTTEY, S., M. A. BLOCK, M. ALLEN, T. WESTERGREN, C. ALBRIEUX, H. V. SCHELLER, S. MERCHANT & P. E. JENSEN (2003). „Arabidopsis CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.26, S. 16119–16124. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.2136793100.
- TOWBIN, H., T. STAEGELIN & J. GORDON (1992). „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979“. In: *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24, S. 145–149. ISSN: 0740-7378.
- TZVETKOVA-CHEVOLLEAU, T., F. FRANCK, A. E. ALAWADY, L. DALL’OSTO, F. CARRIÈRE, R. BASSI, B. GRIMM, L. NUSSAUME & M. HAVAUX (2007). „The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in Arabidopsis thaliana“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 50.5, S. 795–809. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2007.03090.x.
- VAVILIN, D. & W. VERMAAS (2007). „Continuous chlorophyll degradation accompanied by chlorophyllide and phytol reutilization for chlorophyll synthesis in Synechocystis sp. PCC 6803“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1767.7, S. 920–929. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.03.010.
- VERDECIA, M. A., R. M. LARKIN, J.-L. FERRER, R. RIEK, J. CHORY & J. P. NOEL (2005). „Structure of the Mg-chelatase cofactor GUN4 reveals a novel hand-shaped fold for porphyrin binding“. In: *PLoS biology* 3.5, e151. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030151.
- VINYARD, D. J., G. M. ANANYEV & G. C. DISMUKES (2013). „Photosystem II: the reaction center of oxygenic photosynthesis“. In: *Annual review of biochemistry* 82, S. 577–606. DOI: 10.1146/annurev-biochem-070511-100425.
- WAGNER, R., H. AIGNER, A. PRUŽINSKÁ, H. J. JÄNKÄNPÄÄ, S. JANSSON & C. FUNK (2011). „Fitness analyses of Arabidopsis thaliana mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling“. In: *The New phytologist* 191.2, S. 449–458. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03684.x.
- WALKER, C. J. & R. D. WILLOWS (1997). „Mechanism and regulation of Mg-chelatase“. In: *Biochemical Journal* 327 (Pt 2), S. 321–333. ISSN: 0264-6021.
- WALTER, B., A. HRISTOU, M. M. NOWACZYK & D. SCHÜNEMANN (2015). „In vitro reconstitution of co-translational D1 insertion reveals a role of the cpSec-Alb3 translocase and Vipp1 in photosystem II biogenesis“. In: *Biochemical Journal* 468.2, S. 315–324. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/BJ20141425..
- WANG, P. & B. GRIMM (2015). „Organization of chlorophyll biosynthesis and insertion of chlorophyll into the chlorophyll-binding proteins in chloroplasts“. In: *Photosynthesis research* 126.2-3, S. 189–202. DOI: 10.1007/s11120-015-0154-5.
- WANG, P., F.-C. LIANG, D. WITTMANN, A. SIEGEL, S.-O. SHAN & B. GRIMM (2018). „Chloroplast SRP43 acts as a chaperone for glutamyl-tRNA reductase, the rate-limiting enzyme in tetrapyrrole biosynthesis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115.15, E3588–E3596. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1719645115.

- WANG, P., J. LIU, B. LIU, D. FENG, Q. DA, S. SHU, J. SU, Y. ZHANG, J. WANG & H.-B. WANG (2013). „Evidence for a role of chloroplastic m-type thioredoxins in the biogenesis of photosystem II in Arabidopsis“. In: *Plant physiology* 163.4, S. 1710–1728. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.113.228353.
- WANG, P., J. GAO, C. WAN, F. ZHANG, Z. XU, X. HUANG, X. SUN & X. DENG (2010). „Divinyl chlorophyll(ide) a can be converted to monovinyl chlorophyll(ide) a by a divinyl reductase in rice“. In: *Plant physiology* 153.3, S. 994–1003. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.110.158477.
- WANG, Q., S. JANTARO, B. LU, W. MAJEED, M. BAILEY & Q. HE (2008). „The high light-inducible polypeptides stabilize trimeric photosystem I complex under high light conditions in Synechocystis PCC 6803“. In: *Plant physiology* 147.3, S. 1239–1250. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.108.121087.
- WEI, L., J. GUO, M. OUYANG, X. SUN, J. MA, W. CHI, C. LU & L. ZHANG (2010). „LPA19, a Psb27 homolog in Arabidopsis thaliana, facilitates D1 protein precursor processing during PSII biogenesis“. In: *Journal of Biological Chemistry* 285.28, S. 21391–21398. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M110.105064.
- WILDE, A., K. LÜNSER, F. OSSENBUHL, J. NICKELSEN & T. BÖRNER (2001). „Characterization of the cyanobacterial ycf37: mutation decreases the photosystem I content“. In: *Biochemical Journal* 357.Pt 1, S. 211–216. ISSN: 0264-6021.
- WILK, L., M. GRUNWALD, P.-N. LIAO, P. J. WALLA & W. KÜHLBRANDT (2013). „Direct interaction of the major light-harvesting complex II and PsbS in nonphotochemical quenching“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.14, S. 5452–5456. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1205561110.
- WILLIAMS, D. C., G. S. MORGAN, E. McDONALD & A. R. BATTERSBY (1981). „Purification of porphobilinogen deaminase from Euglena gracilis and studies of its kinetics“. In: *Biochemical Journal* 193.1, S. 301–310. ISSN: 0264-6021.
- WITTENBERG, G., S. JÄRVI, M. HOJKA, S. Z. TÓTH, E. H. MEYER, E.-M. ARO, M. A. SCHÖTTLER & R. BOCK (2017). „Identification and characterization of a stable intermediate in photosystem I assembly in tobacco“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 90.3, S. 478–490. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/tpj.13505.
- WITTENBERG, G., A. LEVITAN, T. KLEIN, I. DANGOOR, N. KEREN & A. DANON (2014). „Knockdown of the Arabidopsis thaliana chloroplast protein disulfide isomerase 6 results in reduced levels of photoinhibition and increased D1 synthesis in high light“. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 78.6, S. 1003–1013. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/tpj.12525.
- XU, H., D. VAVILIN, C. FUNK & W. VERMAAS (2002). „Small Cab-like proteins regulating tetrapyrrole biosynthesis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803“. In: *Plant molecular biology* 49.2, S. 149–160. ISSN: 0167-4412.
- XU, H., D. VAVILIN, C. FUNK & W. VERMAAS (2004). „Multiple deletions of small Cab-like proteins in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803: consequences for pigment biosynthesis and accumulation“. In: *The Journal of biological chemistry* 279.27, S. 27971–27979. DOI: 10.1074/jbc.M403307200.
- YABE, T., K. MORIMOTO, S. KIKUCHI, K. NISHIO, I. TERASHIMA & M. NAKAI (2004). „The Arabidopsis chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I“. In: *The Plant cell* 16.4, S. 993–1007. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.020511.
- YANG, H., J. LIU, X. WEN & C. LU (2015). „Molecular mechanism of photosystem I assembly in oxygenic organisms“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1847.9, S. 838–848. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbabo.2014.12.011.
- YAO, D. C. I., D. C. BRUNE, D. VAVILIN & W. F. J. VERMAAS (2012). „Photosystem II component lifetimes in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803: small Cab-like proteins stabilize biosynthesis intermediates and affect early steps in chlorophyll synthesis“. In: *The Journal of biological chemistry* 287.1, S. 682–692. DOI: 10.1074/jbc.M111.320994.
- YAO, D., T. KIESELBACH, J. KOMENDA, K. PROMNARES, M. A. H. PRIETO, M. TICHY, W. VERMAAS & C. FUNK (2007). „Localization of the small CAB-like proteins in photosystem II“. In: *The Journal of biological chemistry* 282.1, S. 267–276. DOI: 10.1074/jbc.M605463200.
- ZELISKO, A., M. GARCÍA-LORENZO, G. JACKOWSKI, S. JANSSON & C. FUNK (2005). „AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.38, S. 13699–13704. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0503472102.
- ZHANG, D., G. ZHOU, B. LIU, Y. KONG, N. CHEN, Q. QIU, H. YIN, J. AN, F. ZHANG & F. CHEN (2011). „HCF243 encodes a chloroplast-localized protein involved in the D1 protein stability of the Arabidopsis photosystem II complex“. In: *Plant physiology* 157.2, S. 608–619. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.111.183301.
- ZHANG, S., G. SHEN, Z. LI, J. H. GOLBECK & D. A. BRYANT (2014). „Vipp1 is essential for the biogenesis of Photosystem I but not thylakoid membranes in Synechococcus sp. PCC 7002“. In: *The Journal of biological chemistry* 289.23, S. 15904–15914. DOI: 10.1074/jbc.M114.555631.

- ZHAO, A., Y. FANG, X. CHEN, S. ZHAO, W. DONG, Y. LIN, W. GONG & L. LIU (2014). „Crystal structure of Arabidopsis glutamyl-tRNA reductase in complex with its stimulator protein“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111.18, S. 6630–6635. issn: 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1400166111.
- ZIEHE, D., B. DÜNSCHEDE & D. SCHÜNEMANN (2017). „From bacteria to chloroplasts: evolution of the chloroplast SRP system“. In: *Biological chemistry* 398.5-6, S. 653–661. doi: 10.1515/hsz-2016-0292.
- ZOSCHKE, R., P. CHOTEWUTMONTRI & A. BARKAN (2017). „Translation and Co-translational Membrane Engagement of Plastid-encoded Chlorophyll-binding Proteins Are Not Influenced by Chlorophyll Availability in Maize“. In: *Frontiers in Plant Science* 8, S. 385. doi: 10.3389/fpls.2017.00385.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum der Jahre 2015 - 2019 in der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin. Ohne die Unterstützung der folgenden Personen hätte sie nicht in der vorliegenden Form realisiert werden können, wofür ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken möchte.

Zuerst möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Bernhard Grimm dafür danken, mir ein spannendes und herausforderndes Thema zur Bearbeitung überlassen zu haben, sowie die Betreuung meiner Promotion übernommen zu haben. Ich bin dankbar für das mir gegenüber entgegengebrachte Vertrauen sowie die große mir eingeräumte Freiheit in der inhaltlichen Ausrichtung und Ausführung der Arbeit.

Den weiteren Gutachtern möchte ich für die zur Bewertung dieser Dissertation aufgewandte Zeit danken.

Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie bin ich dankbar für die jederzeit freundliche, kollegiale und zugewandte Arbeitsatmosphäre. Ich war mir stets sicher mit Fragen auf offene Ohren zu stoßen und bei Problemen konstruktives Feedback und inhaltliche Anregungen bekommen zu können.

Weiteren Mitarbeitern am Institut für Biologie sowie unseren Kooperationspartnern bin ich dankbar für ihre Unterstützung bei der Bearbeitung spezieller Forschungsfragen. Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. Stefan Geimer und Reinhild Rothe von der Universität Bayreuth für die Anfertigung der Elektronenmikroskopie-Aufnahmen, sowie Dr. Heiko Lokstein von der Charles University Prag für seine Unterstützung bei der Fluoreszenz-spektroskopischen Charakterisierung der OHP-Pigment-Komplexe.

Meinen Studenten Jakob Müller und Thomas Andersen danke ich für ihre tatkräftige Hilfe im Labor bei der *in vitro*-Analyse der LIL3-Pigmentbindung (Jakob) bzw. der Charakterisierung der OHP1-RNAi-Linien (Thomas).

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Bärbel Hahn-Hey und Andreas Hey für ihre emotionale Unterstützung im Zeitraum meines Studiums und insbesondere während meiner Promotion. Ihnen ist diese Dissertation gewidmet.

Abschließend danke ich meinen Freunden für die unzähligen gemeinsam verbrachten Spieleabende und die vielen in den letzten Jahren durchgeführten kreativen Projekte. Die Herausforderungen meiner Promotion konnte ich dadurch umso konzentrierter angehen.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin vom 05. März 2015 zur Kenntnis genommen habe, die vorliegende Dissertation gemäß §6 (3) der Promotionsordnung selbstständig verfasst habe, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Weiterhin erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberatern stattgefunden hat, dass die vorliegende Dissertation nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht/angenommen/abgelehnt wurde, und dass ich mich weder andernorts um einen Doktorgrad beworben habe noch einen entsprechenden Doktorgrad besitze. Zudem erkläre ich, dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Daniel Hey, Berlin am 31. Januar 2019